

**DNA-Überstrukturen für neuartige Konzepte in der  
plasmonischen Sensorik**

**Dissertation  
zur Erlangung des akademischen Grades  
„doctor rerum naturalium“ (Dr. rer. nat.)**

**vorgelegt dem Rat der Fakultät für Biowissenschaften  
der Friedrich-Schiller-Universität Jena**

**von M. Sc. Sophie Thamm**

**geboren am 15. September 1989 in Stollberg/Erzgebirge**

1. Gutachter: Prof. Dr. Günter Theißen (Jena)
2. Gutachter: Apl. Prof. Dr. Wolfgang Fritzsche (Jena)
3. Gutachter: PD Dr. Adrian Keller (Paderborn)

Tag der Verteidigung: 13.11.2020

## Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	I
Abbildungsverzeichnis .....	III
Abkürzungsverzeichnis .....	IV
1 Einleitung.....	1
1.1 Optische Eigenschaften plasmonischer Nanopartikel und ihre Anwendung .....	3
1.2 DNA und das Potential zur Selbstorganisation .....	6
2.2.1 DNA-Origami .....	7
2.2.2 Hybridisierungskettenreaktion.....	11
1.3 Ziele der Arbeit.....	13
2 Übersicht zu den Manuskripten .....	14
2.1 M1 – LSPR Detection of Nucleic Acids on Nanoparticle Monolayers .....	14
2.2 M2 – AFM-Based Probing of the Flexibility and Surface Attachment of Immobilized DNA Origami .....	15
2.3 M3 – DNA-Biofunctionalization of CTAC-capped gold nanocubes.....	16
2.4 M4 – MiRNA biosensor based on localized surface plasmon resonance enhanced by surface-bound hybridization chain reaction .....	17
3 Ergebnisse .....	18
3.1 LSPR-basierte Biosensorik.....	18
3.1.1 Plasmonische Nanopartikel als Signalwandler.....	18
3.1.2 M1 – LSPR-Detektion von Nukleinsäuren auf Nanopartikel-Monolayer .....	22
3.1.3 Detektionslimit des Sensors .....	31
3.2 DNA-Überstrukturen für die Sensoroptimierung .....	33
3.2.1 Stabilität von DNA-Origami in Lösung und Immobilisierung auf Glimmer .....	33
3.2.2 M2 – AFM-basierte Untersuchung der Flexibilität und Oberflächenanhaftung von immobilisierten DNA-Origami .....	35
3.2.3 Anordnung von DNA-Origami auf Glimmer .....	46
3.2.4 M3 – DNA-Biofunktionalisierung von Goldnanowürfeln mit CTAC-Hülle.....	48
3.2.5 Anbindung von Goldnanowürfeln an DNA-Origami .....	59

3.2.6 M4 – MiRNA-Biosensor basierend auf lokalisierter Oberflächenplasmonenresonanz verstärkt durch oberflächengebundene Hybridisierungskettenreaktion .....	60
4 Diskussion .....	94
5 Zusammenfassung und Ausblick.....	102
6 Summary and Outlook.....	104
Literaturverzeichnis .....	106
Ehrenwörtliche Erklärung.....	114
Danksagung .....	115



## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1	Komponenten eines Biosensors .....	1
Abbildung 2	Schema der lokalisierten Oberflächenplasmonenresonanz.....	3
Abbildung 3	Schema des LSPR-basierten DNA-Nachweis am Nanopartikel.....	4
Abbildung 4	Feldverstärkung für ein Nanopartikel-Dimer .....	4
Abbildung 5	Struktur der DNA.....	6
Abbildung 6	DNA-Origami Schema.....	7
Abbildung 7	Schema der Hybridisierungskettenreaktion .....	12
Abbildung 8	UV-VIS-Spektren verschiedener Nanopartikellösungen .....	18
Abbildung 9	Bulksensitivitäten verschiedener plasmonischer Nanopartikel.....	20
Abbildung 10	LSPR-Spektrum in Abhängigkeit der Belegungsdichte mit Au 80 .....	21
Abbildung 11	Spezifität und Sensitivität des Biosensors anhand eines Modellsystems.....	31
Abbildung 12	Gelelektrophorese von DNA-Origami in variierender Ionenkonzentration.....	33
Abbildung 13	AFM-Aufnahmen von DNA-Origami auf Glimmer .....	34
Abbildung 14	Anordnung von DNA-Origami auf Glimmer durch Zugabe von Natriumchlorid...	46
Abbildung 15	Simulation der Feldverstärkungen bei Goldnanopartikeln.....	59
Abbildung 16	Konjugation von funktionalisierten Goldnanowürfeln an DNA-Origami.....	59

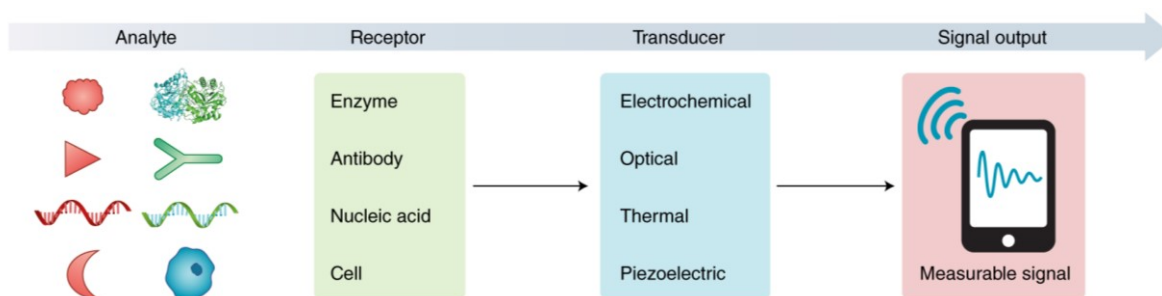
**Abkürzungsverzeichnis**

AFM	Atomic force microscopy
APTES	3-Aminopropyltriethoxysilan
BSP	Bis(p-sulfonatophenyl)phenylphosphin
CTAB	Cetyltrimethylammoniumbromid
CTAC	Cetyltrimethylammoniumchlorid
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
H	Hairpin
HCR	Hybridization chain reaction
IUPAC	International Union of Pure and Applied Chemistry
LOC	Lab-on-a-Chip
LOD	Limit of detection
LSPR	Localized surface plasmon resonance
MCH	6-Mercapto-1-hexanol
miRNA	MicroRNA
mRNA	Messenger RNA
NGS	Next generation sequencing
nt	Nukleotide
PCR	Polymerase chain reaction
POC	Point-of-Care
RIU	Refractive index units
RT	Raumtemperatur
S <sub>b</sub>	Bulksensitivität
SDS	Natriumdodecylsulfat
SPR	Surface plasmon resonance
T	Target
TAE	Tris-Acetate-EDTA
TMSD	Toehold mediated strand displacement
UV-VIS	Ultraviolet and visible light

## 1 Einleitung

Der schnelle und sensitive Nachweis von Pathogenen/Biomarkern ist essentiell für die Diagnostik von Krankheiten. Biomarker sind Moleküle oder Erreger, deren Präsenz/Quantität ein Indikator für den Ausbruch einer Krankheit ist. Mithilfe integrierter Nachweissysteme – der Biosensoren – können solche Moleküle nachgewiesen werden. Nach einer IUPAC-Definition ist ein Biosensor, im Unterschied zu biotischen Sensoren oder Biotests, ein in sich geschlossenes integriertes System, das eine spezifische quantitative oder halb-quantitative analytische Information liefert, und das aus Biorezeptor (biologisches Erkennungselement) und Transducer (Signalwandler) besteht, die sich in direktem räumlichen Kontakt befinden (Abbildung 1).<sup>1,2</sup> Biorezeptoren ermöglichen die spezifische Bindung des Analyten, um ein durch den Transducer messbares Signal zu erzeugen. Je nach Transducer werden Biosensoren differenziert in:

- elektrochemische,
- optische,
- thermische
- und piezoelektrische Biosensoren.



**Abbildung 1 | Komponenten eines Biosensors** Ein Biosensor ist ein in sich geschlossenes System und besteht aus Transducer (Signalwandler) und Rezeptor (biologisches Erkennungselement), um einen Analyten spezifisch nachzuweisen. Das Bindungsereignis wird vom Transducer in ein messbares Signal umgewandelt.<sup>3</sup>

Optische Biosensoren haben sich in den letzten Jahrzehnten als mögliche innovative Lösung für die Krankheitsdiagnostik und Nachsorge herausgestellt. Optische Biosensoren sind Systeme, die unterschiedliche lichtbasierte Phänomene erfassen und so die schnelle Erkennung und Quantifizierung von (klinischen) Biomarkern ermöglichen.

Die plasmonischen Sensoren sind dabei wahrscheinlich die bekanntesten und die am weitesten verbreiteten Systeme. Der Oberflächenplasmonenresonanz-Biosensor (SPR, *surface plasmon resonance*) gilt als Meilenstein in der Bioanalytik. Seit der Einführung des SPR-Biosensorprinzips vor mehr als drei Jahrzehnten<sup>4</sup> wurden diese optischen Biosensoren für die Untersuchung jeglicher Art von biomolekularen Wechselwirkungen kommerzialisiert. SPR-Geräte sind jedoch unhandlich, kostenintensiv und Hochdurchsatzverfahren sind limitiert.

Für den Fall von lokalisierten SPR (LSPR, *localized surface plasmon resonance*) interagiert Licht mit plasmonischen Nanopartikeln statt mit Goldfilmen. In der Sensorik werden plasmonische Nanopartikel verwendet, die viel kleiner als die einfallende Wellenlänge sind. Durch ihre große Sensoroberfläche bei kleiner Sensorfläche und den einfachen Aufbau haben sie großes Anwendungspotential. Diese Biosensor-Plattformen können einige der Herausforderungen bewältigen, mit denen die konventionelle Diagnostik konfrontiert ist – markierungsfreie, parallele Assays mit sofortigen Ergebnissen und der Einsatz möglichst kleiner und benutzerfreundlicher Analysegeräte.

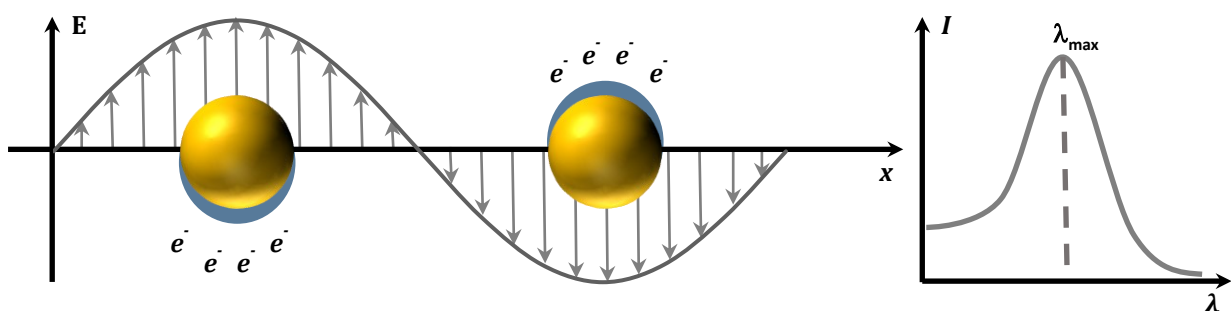
Bei der DNA-Nanotechnologie werden künstliche Nukleinsäurestrukturen für technologische Zwecke entworfen und hergestellt. In diesem Gebiet werden Nukleinsäuren als nichtbiologische Konstruktionsmaterialien denn als Träger genetischer Information in lebenden Zellen verwendet. In dieser Arbeit verschmelzen die festkörperorientierte und die biologisch inspirierte Nanotechnologie miteinander. Hier wird die LSPR-basierte Biosensorik mit DNA-Überstrukturen kombiniert, um die typischen geringen Empfindlichkeiten dieser Sensoren zu verbessern.

## 1.1 Optische Eigenschaften plasmonischer Nanopartikel und ihre Anwendung

In Edelmetallnanopartikeln können einzigartige optische Eigenschaften beobachtet werden, die in makroskopischen Skalen desselben Materials nicht zu finden sind. Ein bekanntes Beispiel ist am Lycurgus-Becher zu beobachten<sup>5</sup>: Der Becher erscheint bei reflektierenden Lichtverhältnissen grünlich grau, während er rot erscheint, wenn Licht von der Innenseite des Bechers durchscheint. Der dichroitische Effekt wird beobachtet, da das Glas mit winzigen Anteilen an kolloidalen Gold- und Silbernanopartikeln bei der Herstellung dispergiert wurde. Dieser Effekt beruht auf der spezifischen Wechselwirkung der Nanopartikel mit Licht.

Hierbei werden kollektive Oszillationen der Leitungsbandelektronen induziert, die als Plasmonen bezeichnet werden. Sie sind abhängig von Größe, Form und Material des Partikels sowie vom Brechungsindex des umgebenden Mediums.<sup>6</sup> Im Jahr 1908 stellte *Gustav Mie* eine Theorie vor, in der die Extinktionsspektren beschrieben wurden, die sich aus den kombinierten Einflüssen von Streuungs- und Absorptionseffekten sphärischer Partikel unterschiedlicher Größe zusammensetzten.<sup>7</sup> In dem eingeschränkten Fall, dass die Partikel viel kleiner als die Wellenlänge des einfallenden Lichts sind, kann die Theorie durch eine Näherung (Rayleigh-Streuung) vereinfacht werden. Es wird ein Dipolmoment induziert, dessen Amplitude abhängig von der Polarisierbarkeit des Nanopartikelmaterials ist. Gold- und Silbernanopartikel stehen dabei im Fokus der Forschung, da deren Resonanz im sichtbaren Frequenzbereich liegt.<sup>8-12</sup>

Frequenzen der stärksten Wechselwirkung mit der einfallenden Welle werden als lokalisierte Oberflächenplasmonenresonanz (LSPR, *localized surface plasmon resonance*) bezeichnet (Abbildung 2). Die Position der LSPR-Bande ist durch die Position des lokalen Maximums ( $\lambda_{\max}$ ) definiert. Dabei können die LSPR-Banden im Bereich des sichtbaren Lichts liegen, was zu ihrer charakteristischen Farbe und damit beispielsweise zu ihrer Wirkung im Lycurgus-Becher führt.

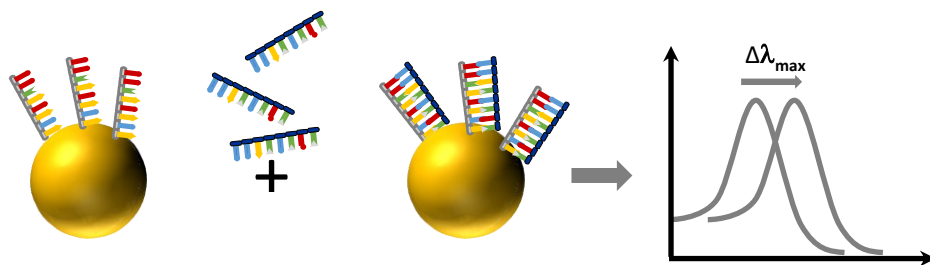


**Abbildung 2 | Schema der lokalisierten Oberflächenplasmonenresonanz** Darstellung einer Plasmonenoszillation (Elektrisches Feld  $E$  in Abhängigkeit der Lichtwelle  $x$ ) für eine Kugel sowie der Verschiebung der Ladungsträgerwolke der Elektronen  $e^-$  relativ zum Kern und rechts die resultierende Resonanz (Intensität  $I$  in Abhängigkeit der Wellenlänge  $\lambda$ ).

Die höchste elektrische Feldstärke eines einzelnen Nanopartikels ist auf seine Oberfläche beschränkt und fällt mit zunehmender Entfernung exponentiell ab.

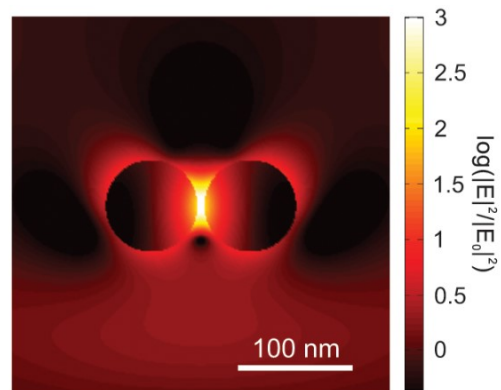
Nanopartikel sind sensitiv gegenüber Änderungen des Brechungsindex des umgebenden Mediums. Diese Brechungsindexänderung in der Partikelumgebung kann beispielsweise durch Anbindung von Biomolekülen hervorgerufen werden. Dadurch ist es möglich, diese Moleküle über die spektrale Verschiebung der Plasmonenresonanz an Einzelpartikeln, Partikelmonolagen und in Lösung (Kolorimetrie) zu detektieren (*refractive index sensing*). Daher werden Nanopartikel aktuell intensiv für den Einsatz als chemische<sup>13</sup> und biologische Sensoren<sup>13,14</sup> erforscht. In diesem Zusammenhang werden Einsatzmöglichkeiten für die Detektion von Proteinen<sup>15-17</sup>, Antikörpern<sup>18</sup> und DNA-Molekülen erforscht<sup>19-21</sup>.

Die Selektivität wird hierbei durch die Funktionalisierung der Nanopartikeloberfläche mit einem Biorezeptor erreicht, an welchen das zu detektierende Molekül (Analyt/Target) spezifisch binden kann. Die Abbildung 3 veranschaulicht den LSPR-basierten DNA-Nachweis.



**Abbildung 3 | Schema des LSPR-basierten DNA-Nachweises am Nanopartikel** Der Biosensor (Biorezeptor + Transducer) weist den Analyt/Target durch Resonanzverschiebung nach.

Diese LSPR-basierten Biosensoren bieten das Potential zur markierungsfreien und parallelen Detektion. Jedoch leiden sie an geringen Sensitivitäten. Plasmonische Nanostrukturen können nicht-elastische optische Effekte auf Moleküle oder Quantenobjekte durch lokale Feldverstärkung erhöhen. Außergewöhnlich hohe elektromagnetische Felder können zwischen zwei benachbarten Nanopartikeln entstehen. Diese Felderhöhungen beruhen auf resonanten Wechselwirkungen aller involvierten Ladungsträger der gesamten Geometrie. So bilden sich unter anderem große elektrische Dipole über der Lücke zwischen den Partikeln, wodurch verstärkte lokale Felder entstehen, die auch als "*hot spots*" bezeichnet werden. Die beschriebenen Effekte sind dabei stark abhängig vom Abstand der Partikel zueinander, welcher kleiner als die LSPR-Eindringtiefe sein muss und im Bereich weniger Nanometer liegt, um diese Kopplungseffekte der optischen Nah-



**Abbildung 4 | Feldverstärkung für ein Nanopartikel-Dimer** Simulierte Intensitätsverstärkung (logarithmische Skala) bei einem Abstand von 6 nm.<sup>22</sup>

felder zu ermöglichen. Die Eindringtiefe ist dabei definiert als der Abstand von der dielektrischen Oberfläche, bei dem die Leistung auf  $1/e$  von ihrem Wert an der Oberfläche abfällt. Abbildung 4

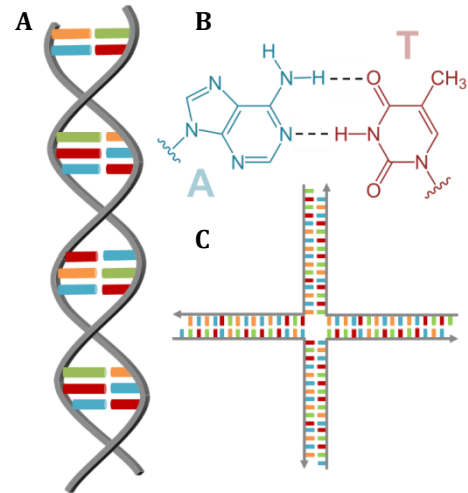
zeigt die Feldverstärkung für ein Nanopartikel-Dimer mit einem Abstand von 6 nm.<sup>22</sup> Das sensorische Prinzip der Resonanzkopplung basiert auf diesem Effekt. Jeder Analyt, der diesen „hot spot“ durchläuft, unterliegt den verstärkten elektrischen Feldern, die für Anwendungen in der markierungsfreien Sensorik, metallverstärkten Fluoreszenz und Spektroskopie genutzt werden können.<sup>23–25</sup> Die DNA-Nanotechnologie ermöglicht eine derartige gerichtete Kopplung der Nanopartikel.<sup>26</sup> Jede Sequenz ist bekannt und so können Modifikationen an genau definierten Positionen angebracht werden, um die Nanopartikel präzise an einem DNA-Gerüst anzubinden und die Resonanzen zu koppeln. Die meisten dieser Nanopartikel-dekorierten DNA-Gerüste wurden mit sphärischen Goldnanopartikeln realisiert.<sup>27,28</sup> Besonders interessant sind jedoch Designs mit formanisotropen Nanopartikeln, da elektrische Felder an scharfen Kanten, z. B. bei Würfeln und Stäbchen, signifikant verstärkt werden. Diese Geometrie ermöglicht eine maximale Amplitude der Elektronenwolkenoszillation.<sup>29–31</sup>

Bei der Biofunktionalisierung von Nanopartikeln spielen oberflächenstabilisierende Liganden eine entscheidende Rolle. Sie können schon während der Keimbildung und des Wachstums der Nanopartikeln involviert sein (Oberflächenpassivierung während der Synthese) oder sie können nachträglich hinzugefügt werden, um Liganden an der Oberfläche der Nanopartikel auszutauschen.<sup>32</sup> Die Oberflächenliganden bestimmen nicht nur Größe und Form der Partikel, sie stabilisieren auch gegen Aggregation und verringern die Reaktivität der Oberflächenatome. Folglich beeinflussen die Liganden die Oberflächenladung des Partikels und die Wechselwirkungen zwischen Ligand und Reaktand.<sup>32</sup> Hierbei führen unterschiedliche Liganden durch zwei Mechanismen zu unterschiedlichen Partikelformen: Beeinflussung der Reduktionskinetik der verwendeten Metallprekursoren bei der Nanokristallsynthese<sup>33</sup> oder der Wirkung als Facettenblocker, indem sie bestimmte kristallographische Ebenen selektiv passivieren und so ein gerichtetes, formanisotropes Wachstum induzieren<sup>34</sup>. Dieser Prozess erschwert oft eine weitere Funktionalisierung des Partikels. Folgende Verfahren wurden entwickelt, um dieses Problem zu adressieren: Ligandenaustauschreaktionen, Konjugation einer funktionellen Gruppe an den bereits angebundenen Liganden und elektrostatische Interaktion zwischen Ligand und Reaktand.<sup>35</sup>

## 1.2 DNA und das Potential zur Selbstorganisation

In der Natur ist Desoxyribonukleinsäure (DNA, *deoxyribonucleic acid*) ein hoch komprimierter Speicher für genetische Informationen, der den Bauplan eines ganzen Organismus kodiert. 1953 wurde die räumliche Struktur der DNA zeitgleich von *Rosalind Franklin* und *James Watson/Francis Crick* entdeckt. Die DNA ist eine Doppelhelix zweier antiparalleler Polynukleotid-Stränge.<sup>36</sup> Die rechtsgängige Doppelhelix der B-DNA (die häufigste Form, Abbildung 5A/B) wurde mit 2 nm Durchmesser bestimmt und weist eine helikale Verdrehung von etwa 10,5 Nukleotiden (nt) pro Windung auf, mit einem Nukleotidabstand von 0,34 nm.

Strategien zur molekularen Selbstorganisation beinhalten die Bildung von Objekten und Materialien im Nanometerbereich ohne wesentliche externe Kontrolle. Die strukturelle DNA-Nanotechnologie nutzt die Selbstorganisation und die damit einhergehenden einzigartigen Eigenschaften von DNA, einschließlich ihrer geringen



**Abbildung 5 | Struktur der DNA** Die rechtsgängige Doppelhelix (A), die Basenpaarung durch zwei Wasserstoffbrückenbindungen zwischen Adenin und Thymin und die Holliday-Junction (C) sind abgebildet.

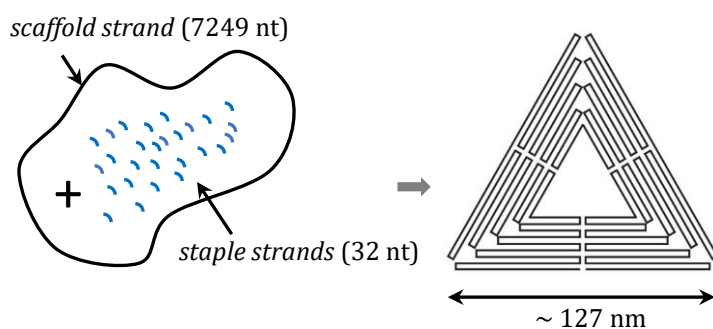
Größe. Für viele Anwendungen ist DNA aufgrund ihrer spezifischen und gut verstandenen Basenpaar-Wechselwirkungen die erste Wahl für die programmierbare Konstruktion supramolekularer Materialien. Die sequenzabhängige DNA-Hybridisierung wird zu Konstruktionszwecken genutzt, wobei DNA-Stränge das Baumaterial sind und die Nukleobasen als programmierbarer „Klebstoff“ verstanden werden können. Eine der einfachsten Montageeinheiten ist die Holliday-Junction (Abbildung 5C), ein in der Natur gefundenes Motiv mit zwei sich kreuzenden Doppelhelices. *Ned Seeman* entwickelte 1982 die Vision, zahlreiche Holliday-Verbindungen durch *Sticky-End*-Hybridisierung (Hybridisierung mit klebrigen Enden) zu periodischen Nukleinsäure-Netzwerken zu verbinden und als programmierbare, 2D-kristalline Gerüste für die Proteinbindung in der Kristallographie zu verwenden.<sup>37</sup> Einige Jahre später demonstrierte seine Gruppe, mithilfe des Prinzips der miteinander verbundenen DNA-Verzweigungen, die Konstruktion eines künstlichen DNA-Nanobjekts – ein Würfel mit Doppelhelices als Kanten.<sup>38</sup> Durch die Einführung zweier Kreuzungen zwischen antiparallelen DNA-Helices wurden steifere Einheiten (sogenannte DX-Moleküle) erreicht, die größere Netzwerke bilden könnten.



### 2.2.1 DNA-Origami

In der Nanotechnologie existieren zwei Grundprinzipien zur Herstellung von Nanostrukturen. Der *Top-Down*-Ansatz umfasst die Zerkleinerung eines Grundmaterials, um Partikel in Nanogröße zu erhalten (Methodik der Mikrosystemtechnik z.B. Photolithographie). Im Gegensatz dazu steht der *Bottom-Up*-Ansatz für den Aufbau eines Materials von unten: Atom für Atom, Molekül für Molekül oder Cluster für Cluster (physikalisch-chemische Prinzipien der molekularen/atomaren Selbstassemblierung und Selbstorganisation werden ausgenutzt).

In seiner bahnbrechenden Veröffentlichung aus dem Jahr 2006 zeigte *Paul Rothemund*, wie sich die Ausbeute großer und komplexer DNA-Strukturen mithilfe einer Technik verbessern lässt, die er als DNA-Origami bezeichnet.<sup>39</sup> DNA-Origami bestehen aus einem großen Satz von synthetisch hergestellten Oligonukleotiden (je ca. 32 nt, *staple strands*) und einem relativ langen, natürlichen, einsträngigen und zirkulären DNA-Molekül (*scaffold strand*, meist Genom des *M13mp18-Virus*). Durch Hybridisierung der *staple strands* an definierten Positionen mit dem *scaffold strand* wird



**Abbildung 6 | DNA-Origami Schema** Unter Zugabe von Magnesium und Anwendung eines Temperaturgradienten, wird der *scaffold strand* mithilfe der *staple strands* in die gewünschte Form (hier Dreiecke) gefaltet.

das DNA-Origami gefaltet (Abbildung 6). Die Form der resultierenden Struktur wird durch die Klammerfolgen definiert und durch die vielen Überkreuzungen zwischen *staple strands* und *scaffold strand* zusammengehalten. Der Abstand zwischen den benachbarten Kreuzungen entlang jeder Helix beträgt 1,5 He-

lixwindungen (16 Basenpaare), wodurch einer der Stränge kontinuierlich durch jede benachbarte Helix geführt werden kann und als Gerüst dient.<sup>39</sup> Eine Schlüsseleigenschaft von DNA-Origami und anderen DNA-Nanostrukturen besteht darin, dass die Position jedes Nukleotids durch die Input-DNA-Sequenz definiert, somit bekannt und modifizierbar ist. Durch das Anbringen unterschiedlicher Modifikationen (Thiole, Biotin, Aldehyde, Amine, Fluoreszenzfarbstoffe, etc.) an definierten Positionen des DNA-Origami-Gerüsts wird die Selbstorganisation von noch komplexeren Nanostrukturen ermöglicht. Darüber hinaus können *staple strands* so verlängert werden, dass einzelsträngige Überhänge definierter Sequenz aus dem DNA-Origami herausragen. Diese Fangstränge können als Anknüpfungspunkte für Nanokomponenten verwendet werden, die DNA-Einzelstränge einer komplementären Sequenz tragen. Das benutzerdefinierte Strukturdesign mit Platzierung von anderen Nicht-DNA Objekten an definierten Positionen machen DNA-Origami zu einem vielseitigen Werkzeugkasten mit unzähligen Anwendungen. DNA-Origami half unter anderem dabei, Lipidmembrankanäle, Nanotransporter für die Medikamentenabgabe, Nanodrähte,

Nanosensoren, enzymatische Nanoreaktoren, und funktionelle Gerüste für grundlegende biophysikalische Untersuchungen zu schaffen.<sup>26,40</sup>

DNA-Origami kann in variierender Größe und Form hergestellt werden. Im ersten Bericht über DNA-Origami von Paul Rothemund aus dem Jahr 2006 wurden planare, verschieden geformte, zweidimensionale (2D) Objekte mit Längenskalen um 100 nm konstruiert. Die Strukturen reichten von einfachen rechteckigen über drei- und fünfzackige Sternformen bis hin zu komplexen Smiley-Flächen. Topologisch gesehen enthielten diese 2D-DNA-Origamis DNA-Doppelhelices, die innerhalb einer 2D-Ebene durch *crossover* gebündelt waren, wobei sich DNA-Stränge zwischen benachbarten DNA-Helices kreuzten. Einfache 3D-Hohlbehälter – ein Tetraeder<sup>41</sup> und ein Würfel<sup>42</sup> – wurden 2009 durch die Faltung von planaren 2D-DNA-Origamis konstruiert. Ein Meilenstein bei der Konstruktion von 3D-DNA-Origami-Strukturen wurde 2009 von *Shih* und seinen Mitarbeitern eingeführt, als sie DNA-Helices zu einem Wabengitter bündelten, um feste 3D-Objekte zu konstruieren.<sup>43</sup> Eine Methode zur Größenerweiterung von DNA-Origami ist die Verwendung längerer Gerüst-DNA, wie mehrere Veröffentlichungen zeigen.<sup>44,45</sup> Demgegenüber steht der hierarchische Zusammenbau einzelner DNA-Origami zu einem größeren Konstrukt. Zahlreiche dieser DNA-Origami-Superstrukturen wurden bereits realisiert – ein Strandball aus Drahtgitter oder Zahnräder mit quadratischen Zähnen<sup>46</sup>, verschiedene Polyeder mit einer Kantenlänge von 100 nm<sup>47</sup> und mikrometergroße ein- und zweisträngige Fäden und Gitter sowie rekonfigurierbare Vorrichtungen, einschließlich eines Aktuators, eines schaltbaren Getriebes, eines entfaltbaren Nanobuchs und eines Nanoroboters<sup>48</sup>.

Um DNA-Origami für unterschiedliche Anwendungen nutzen zu können, muss eine Integration in Netzwerke realisiert werden. Insbesondere für Nanokonstruktion ist die präzise Integration und Positionierung dieser DNA-Nanostrukturen von großem Interesse, da hierdurch eine nanoskalige Plattform geschaffen werden kann. Dies erfordert ein kontrollierbares Einbetten der Strukturen in bestimmten Bereichen eines ausgewählten Substrats. Verschiedene Techniken, wie die lithographische Strukturierung (teilweise kombiniert mit chemisch unterstützter Immobilisierung)<sup>49–53</sup>, das dielektrophoretische Einfangen<sup>54,55</sup> und die Integration in Nanoporen durch ein elektrisches Feld<sup>56,57</sup>, wurden hierfür erforscht. Diese Integrationstechniken sind in Bezug auf Kosten und/oder Durchsatz begrenzt und basieren auf dem *Top-Down*-Ansatz. Daher stießen Selbstorganisationsansätze zur Erzeugung von Gittern und Mustern mittels planarer DNA-Origami auf zunehmendes Interesse. Sie können als Steckbretter im Nanomaßstab genutzt werden und eignen sich besonders zur Nanofunktionalisierung von Grenzflächen.

Ein 2D-Kristallgitter auf dieser Basis wurde von *Liu et al.* demonstriert, die *sticky ends* zur Ligation der DNA-Origami untereinander nutzten.<sup>58</sup> Lipid-basierte Arrays lassen sich präzise mittels *Top-Down*-Methoden herstellen und bildeten die Basis, um DNA-Origami gerichtet anzulagern.<sup>59–61</sup> *Woo et al.* verwendeten ionenbasierte Wechselwirkungen, um ein Schachbrett aus rechteckigen

DNA-Origami ohne Überhang (*blunt ends*) auf Glimmer zu erzeugen, indem eine Remobilisierung durch Zugabe von 700 mM Natriumchlorid (NaCl) induziert wurde, bevor die Mobilität durch Zugabe von  $\text{Ni}^{2+}$  gestoppt wurde.<sup>62</sup> Die Adsorption von DNA-Nanostrukturen wird typischerweise durch  $\text{Mg}^{2+}$ -Ionen vermittelt, die als Salzbrücke zwischen Glimmer und DNA wirken. Glimmer (*Muscovite Mica*) ist ein Schichtsilikat und zeichnet sich durch atomar flache und chemisch inerte Oberflächen aus, die durch eine perfekte Spaltung parallel zu den {001}-Ebenen erzeugt werden. Glimmer ist als Substrat in Bereichen wie der Rasterkraftmikroskopie, der Biotechnologie und der Materialwissenschaft weit verbreitet, da er sich durch seine kristallin-flache Oberfläche für die Abscheidung von biologischen Materialien, dünnen Metallfilmen oder geordneten Molekularschichten eignet.<sup>63</sup> Diese Wechselwirkung kann durch Zugabe einwertiger Kationen wie  $\text{Na}^+$  abgeschwächt werden, indem  $\text{Mg}^{2+}$  teilweise ersetzt und so eine diffuse Ladungsschicht gebildet wird.<sup>64</sup> Folglich werden die DNA-Origami mobil und bilden Gitter. *Rafat et al.* untersuchten die Wirkung von  $\text{Na}^+$  als Ergänzung des Faltungspuffers mit nicht wechselwirkenden DNA-Origami, um eine Selbstorganisation an der Oberfläche zu induzieren, die zu großräumigen Gittern führt.<sup>65</sup> *Kielar et al.* untersuchten die Entwicklung von 2D-DNA-Origami-Gittern auf Glimmer mithilfe von In-situ-Hochgeschwindigkeits-Rasterkraftmikroskopie und beobachteten dabei eine Abhängigkeit der Gitterordnung von der  $\text{Na}^+$ -Konzentration und Reaktionszeit.<sup>66</sup> Solche geordneten DNA-Origami-Arrays unterteilen den Raum in verschiedene periodische Domänen, in die eine Vielzahl von nanoskaligen Objekten integriert und schließlich als Nanosensor für die Nanoelektronik/Nanosensorik und die Übertragung von Strukturen in der Lithographie verwendet werden können.<sup>51,67–70</sup>

Ein Übersichtsartikel von *Ned Seeman* und *Chad Mirkin* aus dem Jahr 2015 beschreibt die synergetische Koevolution der Bereiche der DNA-Nanotechnologie und DNA-konjugierter Goldnanopartikel.<sup>71</sup> DNA-konjugierte Goldnanopartikel wurden von *Chad Mirkin* und *Paul Alivisatos* als vielseitig einsetzbare Werkzeuge in der DNA-Analytik eingeführt.<sup>72,73</sup> Die Bindung der DNA an die Goldnanopartikel erfolgte über thiolmodifizierte DNA-Einzelstränge.<sup>74</sup> Später folgten analog Silbernanopartikel.<sup>75,76</sup> Die Bindung von DNA an Nanopartikel erfolgt auch unspezifisch, denn die Nukleobasen weisen eine Affinität zu den Edelmetallen auf. So adsorbiert selbst unmodifizierte DNA über die Basen mit der Adsorptionsenergie in absteigender Reihenfolge Adenin, Cytosin, Guanin, Thymin und Phosphat stark an einer Goldoberfläche.<sup>77,78</sup> Etablierte Techniken für die Konjugation von Nanopartikeln mit DNA sind: *salt aging*<sup>79</sup>, Tensid-gestützte Funktionalisierung<sup>80</sup>, pH-assistierte Funktionalisierung<sup>81</sup> und *depletion stabilization*<sup>82</sup>.

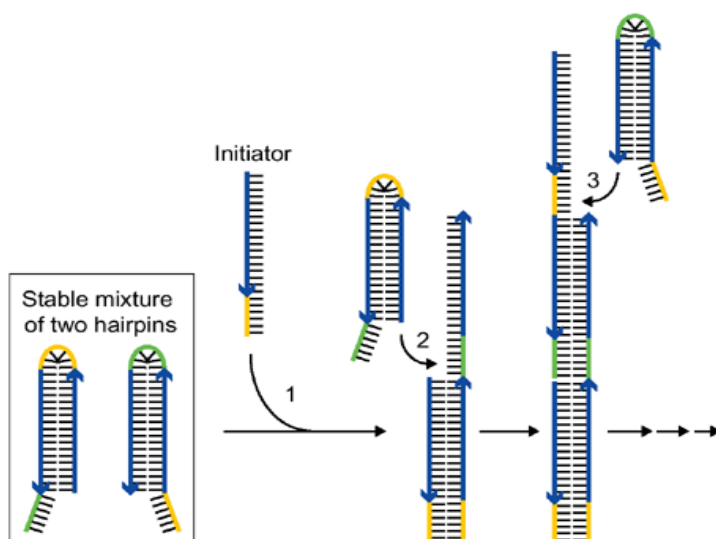
DNA-konjugierte Nanopartikel können nun an definierten Positionen des DNA-Origami durch komplementäre Fangstränge platziert werden. Die Organisation von Nanopartikeln auf dem DNA-Origami innerhalb der gegebenen Strukturauflösung von 5,4 nm (16 Basenpaare)<sup>39</sup> ermöglicht die Steuerung des plasmonischen Verhaltens dieser DNA-Origami-Nanopartikel-Komplexe. Bisher

wurden die meisten Designs mit sphärischen Goldnanopartikeln realisiert.<sup>26-28</sup> Besonders interessant sind jedoch Designs mit formanisotropen Nanopartikeln, da elektrische Felder an scharfen Kanten, z. B. bei Würfeln und Stäbchen, signifikant verstärkt werden. Folgende DNA-Origami-Designs mit formanisotropen Partikeln/Partikeldimeren wurden untersucht: helikale Überstrukturen aus Goldnanostäben mit konstruierter Chiralität<sup>83</sup>, *Nanobowties* aus Goldprismen<sup>84</sup>, Nanostern-Baugruppen<sup>85</sup> und Goldnanostab-Dimere in definierten Winkeln<sup>86</sup> und Abständen<sup>87</sup>. Der Synthesepuffer des DNA-Origami mit hoher Ionenstärke von 10-12 mM  $\text{MgCl}_2$  ist eine anspruchsvolle Umgebung für DNA-konjugierte Nanopartikel aufgrund der durch die Ionen induzierten Abschirmung der Ladungen. Nur hohe Belegungsdichten mit DNA können die erforderliche elektrostatische Abstoßung sicherstellen, um Partikelaggregation durch Magnesiumchlorid zu verhindern. Speziell für formanisotrope Nanopartikel, welche oft mit Hilfe von Facettenblockern, wie Cetyltrimethylammoniumbromid (CTAB) und Cetyltrimethylammoniumchlorid (CTAC), synthetisiert werden, gibt es meist nur aufwändige Funktionalisierungsmethoden.

### 2.2.2 Hybridisierungskettenreaktion

DNA kann nicht nur als selbstorganisierender Baustein für Nanoobjekte, sondern auch als vielseitiges Objekt betrachtet werden, das dynamische und automatische Schalter dank metastabiler Bedingungen in einem dynamischen Ungleichgewicht erzeugen kann. Ein Beispiel für einen solchen Prozess ist die durch einen Molekülüberhang verursachte Strangverdrängung (TMSD, *toehold mediated strand displacement*).<sup>88</sup> Hierbei handelt es sich um ein isothermales, enzymfreies und molekulares Werkzeug, um einen DNA- oder RNA-Strang mit einem anderen Strang auszutauschen und bei dem native metastabile Sekundärstrukturen von DNA/RNA eine wichtige Rolle spielen. Auf diese Weise können DNA-Nanostrukturen auch kinetisch kontrolliert werden, indem die beteiligte Sequenz definiert wird. TMSD wurde erstmals im Jahr 2000 auf dem Gebiet der DNA-Nanotechnologie eingeführt.<sup>89</sup> Mithilfe dieser Technik wurde eine Reihe von DNA-Pinzetten geöffnet und geschlossen, welche aus zwei DNA-Helices bestehen und einen zusätzlichen DNA-Strang als eine Art „Brennstoff“ verwenden.<sup>89,90</sup> Seitdem wurde TMSD für den Bau autonomer molekularer Motoren, katalytischer Verstärker, reprogrammierbarer DNA-Nanostrukturen und molekularer Gatter modifiziert.<sup>90,91</sup>

Niles Pierce und Robert Dirks demonstrierten 2004, wie die Bindung von DNA an ein Substrat die Rolle der Erkennung und Signalamplifikation ohne externe Zugaben erfüllen kann. Dies wird durch die ausgelöste Selbstorganisation von DNA-Nanostrukturen in einem Prozess erreicht, der als Hybridisierungskettenreaktion (HCR, *hybridization chain reaction*) bezeichnet wird und eine Form der TMSD darstellt. Der Schlüssel zu HCR in seiner einfachsten Form ist die Speicherung potentieller Energie in zwei Haarnadelspezies (*hairpins*), welche auf sich selbst zurückgefaltete DNA-Moleküle darstellen. Die Erkennung der resultierenden Produkte erfordert keine speziellen Techniken außer die Gelelektrophorese. Im Gegensatz zur Polymerasekettenreaktion (PCR, *polymerase chain reaction*), die eine exponentielle Vervielfältigung bereitstellt, liegt bei der HCR eine lineare Vervielfältigung vor.<sup>92,93</sup> Die Reaktion (Abbildung 7) besteht aus der Anordnung stabiler DNA-Monomere zu größeren Strukturen durch Zugabe eines Initiators (DNA-Molekül mit geeigneter Sequenz) bei gleichbleibender Temperatur. Die Monomere im ursprünglichen Reaktionsdesign sind *hairpins* bestehend aus einem langen Schaft (18 nt), kurzer Schleife und einem kurzen *toehold* (beide 6 nt). Die beiden unterschiedlichen Monomere liegen in äquivalenten molaren Konzentrationen vor und koexistieren stabil in Lösung ohne miteinander zu reagieren. Das Gleichgewicht des Systems wird durch die Zugabe des passenden Initiators (Target, T) aufgehoben und



**Abbildung 7 | Schema der Hybridisierungskettenreaktion** Der Initiator (1) startet eine Hybridisierungskaskade (2, 3) zwischen zwei *hairpins* durch eine Strangverschiebung unter isothermalen Bedingungen.<sup>93</sup>

tisch ist. Die resultierende Kettenreaktion führt zur Bildung einer gekerbten Doppelhelix, die so lange wächst, bis die *hairpins* aufgebraucht sind. Die lineare Amplifikation konnte erfolgreich in plasmonische Biosensoren implementiert werden<sup>94,95</sup> und ermöglicht die hochsensitive Detektion von DNA<sup>96</sup>, Proteinen<sup>97</sup> und *MicroRNA*<sup>98</sup>.

*MicroRNAs* (miRNA) bestehen zumeist aus 21-23 nt, die im Erbgut kodiert sind. Sie erfüllen wichtige Aufgaben bei der Steuerung grundlegender biologischer Prozesse wie Zellentwicklung, Zelldifferenzierung, Proliferation und Apoptose. Neuere Daten weisen darauf hin, dass miRNA auch an der Entstehung menschlicher Krankheiten wie Krebs oder Stoffwechselstörungen beteiligt sind. Sie blockieren die Genaktivität, indem sie sich an die 3'-nicht-translatierten Bereiche von Boten-RNA (mRNA) anlagern. Extrazelluläre/zirkulierende miRNA wurden in biologischen Flüssigkeiten, wie Plasma und Serum, Zerebrospinalflüssigkeit, Speichel, Muttermilch, Urin, Tränen, Kolostrum, Peritonealflüssigkeit, Bronchialflüssigkeit Samenflüssigkeit und Ovarialfollikelflüssigkeit nachgewiesen.<sup>99</sup> Das Vorhandensein von miRNA in zahlreichen Körperflüssigkeiten kann genutzt werden, um einerseits die miRNA als Biomarker zu detektieren und so Krankheiten zu diagnostizieren und andererseits biologische/regulatorische Mechanismen zu verstehen. Etablierte Nachweismethoden für miRNA sind einerseits konventionelle molekularbiologische Ansätze wie *Northern blotting*, *miRNA microarray* und *q-RT PCR*. Andererseits stehen sowohl optische als auch elektrochemische Sensoren zur Verfügung.<sup>100</sup> Aktuell werden beispielsweise auch mikrofluidische Ansätze und *next generation sequencing* (NGS) verfolgt.<sup>100</sup> Diese Techniken haben oft Probleme bei der Quantifizierung dieser kurzen Nukleinsäuren. Daher sind neue Techniken für deren empfindlichen und spezifischen Nachweis erforderlich.

somit eine Kaskade von TMSD ausgelöst, die zur Bildung einer langen geknickten doppelsträngigen DNA führen. Wenn ein einzelsträngiger DNA-Initiator zu dieser zuvor stabilen Mischung hinzugefügt wird, öffnet er den ersten *hairpin* (H1), wodurch eine neue einzelsträngige Region freigelegt wird, die den zweiten *hairpin* (H2) öffnet. Dieser Prozess legt wiederum einen einzelsträngigen Bereich frei, der mit dem ursprünglichen Target identisch ist.

### 1.3 Ziele der Arbeit

Ein Kernelement ist die Eignung der LSPR-Sensoren als Transducer, welcher das Bindungsereignis in ein messbares Signal umwandelt. Da die Stärke des Signals vom elektromagnetischen Feld des Nanopartikels und vom umgebenden Medium abhängt, können Signalverstärkungsmethoden wie die gerichtete Resonanzkopplung mit biofunktionalisierten Goldnanowürfeln und selbstorganisierenden Strukturen, wie Hybridisierungskettenreaktion und DNA-Origami, angewendet werden. Die DNA-Nanotechnologie ermöglicht die Optimierung des Designs von Nanostrukturen und die Verbesserung der Empfindlichkeit und der Nachweisgrenzen von LSPR-Sensoren für zukünftige *Point-of-Care*-Nachweissysteme (POC-Nachweissysteme).

Ziel der vorliegenden Arbeit ist die Demonstration des Potentials einer DNA-Origami-basierten Sensorplattform. Momentan bilden zufällig angeordnete plasmonische Nanopartikel in Ensemble-Form die Sensorplattform. DNA-Origami stellt einen Ansatz dar, um die Nanopartikel genau zu positionieren. So könnte die zufällige Verteilung der Nanopartikel kontrolliert (Arrayentwicklung) und der Transducer durch gezielte Resonanzkopplung optimiert werden. Dafür werden die Stabilität und die Anordnung von DNA-Origami auf der Oberfläche in Abhängigkeit unterschiedlicher ionischer Bedingungen untersucht. Ein weiteres Ziel ist die Funktionalisierung von Goldnanowürfeln und deren Anbindung als Dimer an das DNA-Origami, um einen Nanosensor aufzubauen, welcher im entstehenden „*hot spot*“ Einzelmoleküle nachweisen kann. Beide Strategien basieren auf der Selbstassemblierung und -organisation und ermöglichen eine verbesserte Leistungsfähigkeit plasmonischer Sensoren. Im Falle des Arrays ist die Konstruktion im Mikrometermaßstab möglich.

DNA-basierte Sensoren bieten dank der Verbesserungen, die mit der DNA-Nanotechnologie erreicht werden können, leistungsstarke Alternativen. Ein weiteres Ziel ist die Demonstration des Potentials anhand einer Kombination von HCR und LSPR für den Nachweis einer für asymptotischen Lungenkrebs-spezifischen *MicroRNA* (miR-17). Dabei wird die lineare Amplifikation eingesetzt, um die geringe Sensitivität von markierungsfreien, LSPR-basierten Biosensoren zu erhöhen und sehr geringe Targetkonzentrationen spezifisch zu detektieren. Die Stärke der vorgeschlagenen Strategie liegt in der Einfachheit der Komponenten, welche leicht herzustellen und auf der Biosensor-Plattform zu implementieren sind.

## 2 Übersicht zu den Manuskripten

### 2.1 M1 – LSPR Detection of Nucleic Acids on Nanoparticle Monolayers

Der sequenzspezifische DNA-Nachweis ist wichtig für verschiedene biomedizinische Anwendungen wie die Diagnose und Behandlung von Krankheiten, die Entdeckung von Medikamenten und forensische Analysen. In der Biosensorik stehen spezifische und sensitive Sensoren im Zentrum der Forschung, um geringe Analytkonzentrationen nachweisen zu können. Im folgenden Manuskript wird die Implementierung des DNA-Nachweises in das plasmonische Sensordesign (inklusive Messaufbau) vorgestellt, um den Biosensor anhand eines Modellsystems hinsichtlich Spezifität und Sensitivität zu charakterisieren.

Autorenschaft der Publikation	
<b>Sophie Thamm</b>	Konzeptentwicklung
	Messung und Evaluierung der Daten
	Schreiben des Manuskripts
	Diskussion und Korrektur des Manuskripts
	Diskussion des Konzepts und der Ergebnisse
<b>Andrea Csáki</b>	Diskussion und Korrektur des Manuskripts
<b>Wolfgang Fritzsche</b>	Diskussion und Korrektur des Manuskripts

Thamm S., Csáki A., Fritzsche W. (2018) LSPR Detection of Nucleic Acids on Nanoparticle Monolayers. In: Zuccheri G. (eds) DNA Nanotechnology. Methods in Molecular Biology, vol 1811. Humana Press, New York, NY

Reprinted/adapted by permission from Springer Science+Business Media, LLC, part of Springer Nature: Humana Press, New York, NY "DNA-Nanotechnology. Methods and Protocols" by Giampolo Zuccheri(s) COPYRIGHT (2018).

Eigenanteil: 90%



## 2.2 M2 – AFM-Based Probing of the Flexibility and Surface Attachment of Immobilized DNA Origami

Die intramolekulare Stabilität von DNA-Origami auf Oberflächen ist für die Integration in Netzwerke von zentralem Interesse, denn nur so kann eine nanoskalige Plattform geschaffen werden, mit deren Hilfe Nicht-DNA-Objekte, wie Nanopartikel, präzise positioniert werden können. So könnte die zufällige Verteilung der Nanopartikel kontrolliert (Arrayentwicklung) und der Transducer durch gezielte Resonanzkopplung optimiert werden. Experimente zur intramolekularen Stabilität der DNA-Origami wurden mittels AFM durchgeführt. Abhängig von der Magnesiumionenkonzentration des Immobilisierungsschritts können auf Glimmer immobilisierte dreieckige DNA-Origami entweder geschnitten oder gedehnt werden.

	<b>Autorenschaft der Publikation</b>
<b>Sophie Thamm</b>	Konzeptentwicklung Messung und Evaluierung der Daten Schreiben des Manuskripts Diskussion und Korrektur des Manuskripts Diskussion des Konzepts und der Ergebnisse
<b>Nicole Slesiona</b>	AFM-Messungen Diskussion und Korrektur des Manuskripts
<b>André Dathe</b>	Diskussion und Korrektur des Manuskripts Diskussion des Konzepts und der Ergebnisse
<b>Andrea Csáki</b>	Diskussion und Korrektur des Manuskripts
<b>Wolfgang Fritzsche</b>	Diskussion und Korrektur des Manuskripts Diskussion des Konzepts und der Ergebnisse

*Langmuir* **2018**, 34, 49, 15093-15098

Reprinted with permission from *Langmuir* **2018**, 34, 49, 15093-15098. Copyright (2018) American Chemical Society.

Eigenanteil: 70%

## 2.3 M3 – DNA-Biofunctionalization of CTAC-capped gold nanocubes

Lokale Felderhöhungen lassen sich mit formanisotropen Nanopartikeln erzielen, die mit Hilfe von Facettenblockern wie CTAB und CTAC synthetisiert werden. Eine chemische Modifikation (Ligandenaustausch) der Nanopartikeloberfläche ist jedoch erforderlich, um die Zytotoxizität des Partikels zu verringern, es gegen Aggregation zu stabilisieren und es mit Biomolekülen zu konjugieren, um seine Biokompatibilität für analytische Anwendungen zu erhöhen. Um formanisotrope Nanopartikel gezielt an DNA-Origamis zu binden, müssen diese vorher mit Oligonukleotiden funktionalisiert werden. Dafür wurde ein zweistufiges Protokoll eines Ligandenaustauschs mit Bis(p-sulfonatophenyl)phenylphosphin (BSPP) als intermediären Liganden zur Biofunktionalisierung von CTAC-umhüllten Goldnanowürfeln mit thiolmodifizierter DNA entwickelt.

### Autorenschaft der Publikation

<b>Nicole Slesiona</b>	Konzeptentwicklung
	Messung und Evaluierung der Daten
	Schreiben des Manuskripts
	Diskussion und Korrektur des Manuskripts
	Diskussion des Konzepts und der Ergebnisse
<b>Sophie Thamm</b>	Konzeptentwicklung
	Evaluierung der Daten
	Schreiben des Manuskripts
	Diskussion und Korrektur des Manuskripts
	Diskussion des Konzepts und der Ergebnisse
<b>H. K. Lisa S. Stolle</b>	Herstellung der Goldnanowürfel
	Diskussion und Korrektur des Manuskripts
	Diskussion des Konzepts und der Ergebnisse
<b>Viktor Weißenborn</b>	Herstellung der Goldnanowürfel
<b>Philipp Müller</b>	Erstellung des Skriptes zur Datenanalyse
<b>Andrea Csáki</b>	Diskussion und Korrektur des Manuskripts
	Diskussion des Konzepts und der Ergebnisse
<b>Wolfgang Fritzsche</b>	Diskussion und Korrektur des Manuskripts
	Diskussion des Konzepts und der Ergebnisse

*Nanomaterials* **2020**, 10, 6, 1119

Reprinted with permission from *Nanomaterials* **2020**, 10, 6, 1119. Copyright is retained by the authors.

Eigenanteil: 40%

## 2.4 M4 – MiRNA biosensor based on localized surface plasmon resonance enhanced by surface-bound hybridization chain reaction

Die HCR wird für den Nachweis einer für asymptotischen Lungenkrebs-spezifischen *MicroRNA* (miR-17) eingesetzt, um die geringe Sensitivität von markierungsfreien, LSPR-basierten Biosensoren zu erhöhen und sehr geringe Targetkonzentrationen spezifisch zu detektieren. Die HCR kann zur direkten Signalverstärkung genutzt werden, indem die molekulare Masse nach der spezifischen Detektion des Targets durch spezifische Anlagerung zusätzlicher Moleküle erhöht wird.

### Autorenschaft der Publikation

<b>Andrea Miti</b>	Konzeptentwicklung und Design der HCR Messung und Evaluierung der Daten Schreiben des Manuskripts Diskussion und Korrektur des Manuskripts Diskussion des Konzepts und der Ergebnisse
<b>Sophie Thamm</b>	Konzeptentwicklung Messung der Daten Diskussion und Korrektur des Manuskripts Diskussion des Konzepts und der Ergebnisse
<b>Philipp Müller</b>	Erstellung des Skriptes zur Datenanalyse
<b>Andrea Csáki</b>	Diskussion und Korrektur des Manuskripts
<b>Wolfgang Fritzsche</b>	Diskussion und Korrektur des Manuskripts
<b>Giampolo Zuccheri</b>	Diskussion und Korrektur des Manuskripts Diskussion des Konzepts und der Ergebnisse

*In Begutachtung (eingereicht am 19.05.2020) bei Biosensors and Bioelectronics*

Eigenanteil: 30%

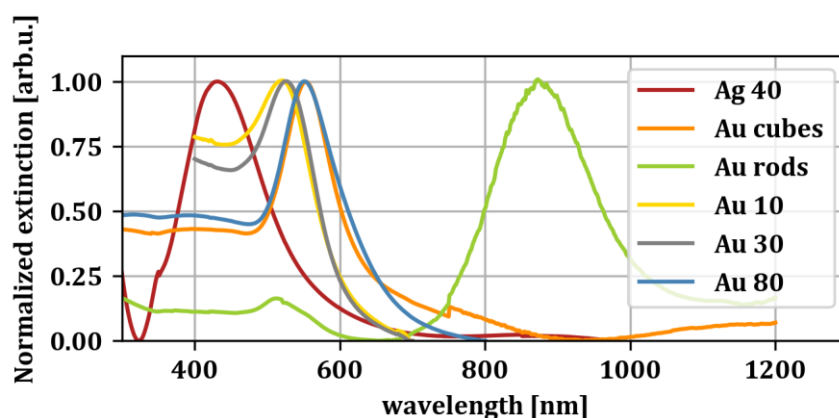
### 3 Ergebnisse

#### 3.1 LSPR-basierte Biosensorik

Die Leistung einer Biosensor-Plattform ist von der Empfindlichkeit des Signalwandlers abhängig, welcher die biochemische Erkennung des Analyten in ein lesbares Signal übersetzt. Das Design von empfindlichen und vielseitigen Signalwandlern, die leicht in *Lab-on-a-Chip*-Geräte (LOC-Geräte) integriert werden können, ist daher eine gegenwärtige Herausforderung. In der LSPR-basierten Biosensorik werden plasmonische Nanopartikel als optische Signalwandler eingesetzt. Der sequenzspezifische DNA-Nachweis ist wichtig für verschiedene biomedizinische Anwendungen wie die Diagnose und Behandlung von Krankheiten, die Entdeckung von Medikamenten und forensische Analysen. In der Biosensorik stehen daher spezifische und sensitive Sensoren im Zentrum der Forschung, um geringe Analytkonzentrationen nachweisen zu können.

##### 3.1.1 Plasmonische Nanopartikel als Signalwandler

Es wurden verschiedene Nanopartikel neben Biokompatibilität und Langzeitstabilität hinsichtlich ihrer optischen Eigenschaften untersucht. Im Fokus steht der Vergleich ihres Spektrums und ihrer Bulksensitivität (Sensitivität bezogen auf die Veränderung in der direkten Partikelumgebung,  $S_b$ ), um deren Qualität als Transducer und damit die Sensorperformance beurteilen zu können. Mithilfe dieser Charakterisierung können die geeigneten Nanopartikel für die Detektion von biochemischen Bindeereignissen selektiert werden. Als Charakterisierungsmethoden kommen sowohl UV-VIS-Spektroskopie für Nanopartikel in Lösungen als auch die LSPR-Spektroskopie immobilisierter Nanopartikel zum Einsatz. Abbildung 8 zeigt die normalisierte Extinktion in Abhängigkeit der Wellenlänge für verschiedene Größen sphärischer und formanisotroper Nanopartikel in Lösung.



**Abbildung 8 | UV-VIS-Spektren verschiedener Nanopartikellösungen** Normalisierte Extinktion in Abhängigkeit der Wellenlänge von sphärischen Silber- und Goldnanopartikeln sowie formanisotropen Goldnanopartikeln. Die sphärischen Silbernanopartikel weisen einen Durchmesser von 40 nm (Ag 40) und die Goldnanopartikel 10 nm (Au 10), 30 nm (Au 30) und 80 nm (Au 80) auf. Die Goldnanowürfel (Au cubes) besitzen eine Kantenlänge von ca. 50 nm und die Goldnanostäbchen (Au rods) sind 51 nm lang und 11 nm breit.

Die Bestimmung der Peakposition erfolgte mittels Schwerpunktberechnung nach *Dahlin et al.*<sup>101</sup>; im folgenden Centroid genannt. Sphärische Silbernanopartikel mit dem Durchmesser von 40 nm (Ag 40) weisen den Centroid bei einer Wellenlänge von 434 nm auf. Die Würfel mit einer Kantenlänge von 50 nm (Au cubes) weisen ihren Centroid bei 553 nm und Stäbchen mit den Maßen 51 nm in der Länge und 11 nm in der Breite (Au rods) bei 875 nm (longitudinal) auf. Sphärische Nanopartikel mit geringerem Durchmesser haben ihren Centroid bei kleinerer Wellenlänge als größere Partikel des gleichen Materials. Der Centroid für sphärische Goldnanopartikel liegen für 10 nm Durchmesser (Au 10) bei 512 nm, für 30 nm Durchmesser (Au 30) bei 523 nm und für 80 nm Durchmesser (Au 80) bei 553 nm.

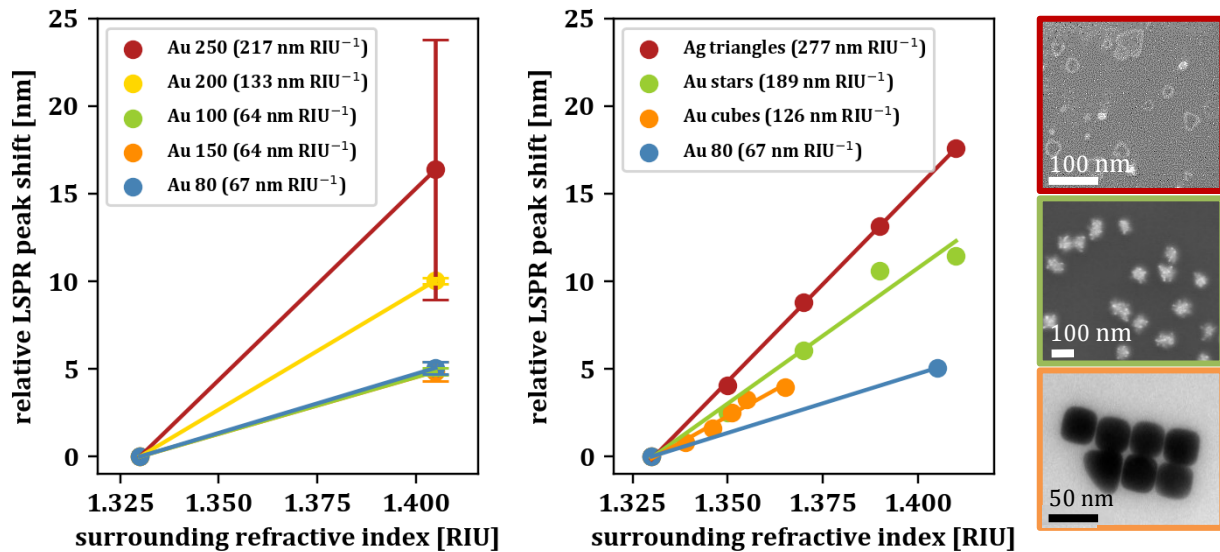
Für die LSPR-Spektroskopie wurden die untersuchten Nanopartikel auf einem Glassubstrat, welches nasschemisch mit 3-Aminopropyltriethoxysilan (APTES) funktionalisiert ist, als Ensemble immobilisiert, in eine mikrofluidische Kammer implementiert und hinsichtlich ihrer Bulksensitivität getestet. Der optische Messaufbau ist in 3.1.2 M1 – LSPR-Detektion von Nukleinsäuren auf Nanopartikel-Monolayerbeschrieben. Die Spektren der Nanopartikel werden kontinuierlich gemessen, damit ist eine Echtzeitverfolgung der Spektren möglich. Der optische Aufbau ist um eine Peristaltikpumpe und die entsprechenden Schläuche erweitert, welche die Flüssigkeiten in genau definierten Zeitintervallen, Volumina und Flussraten in die Kammer pumpt.

Das LSPR-Spektrum der Nanopartikel eignet sich zur Messung des Brechungsindex verschiedener Lösungen, da die Position der LSPR-Bande vom umgebenden Medium abhängig ist. Sobald sich der Brechungsindex des umgebenden Mediums ändert, verschiebt sich auch das Extinktionsmaximum der Nanopartikel im Spektrum. Dabei kann näherungsweise von einer linearen Abhängigkeit ausgegangen werden, welche als Sensitivität  $S_b$  bezeichnet wird und die Positionsänderung pro Brechungsindexeinheit (RIU, *refractive index units*) angibt<sup>102</sup>:

$$S_B = \frac{\Delta\lambda_{centroid}}{\Delta n_{medium}} \left[ \frac{nm}{RIU} \right]$$

Dabei ist  $\lambda_{centroid}$  das Extinktionsmaximum des Partikels in Nanometern und  $n_{medium}$  ist der Brechungsindex in RIU. Für die Messungen wurden wässrige Glukoselösungen verwendet, mit denen der Brechungsindex variiert werden konnte.

Für die sphärischen Nanopartikel wurde glukosehaltige Lösung ( $n_{Gluc} = 1,405$ ) und Wasser ( $n_{H_2O} = 1,333$ ) abwechselnd vermessen (N = 3). Die formanisotropen Nanopartikel wurden mit je vier bzw. fünf verschiedenen Konzentrationen vermessen. Abbildung 9 zeigt die relative Centroidverschiebung in Abhängigkeit des refraktiven Index der Lösung, dabei kann die Bulksensitivität mittels linearer Regression aus dem Anstieg ermittelt werden.



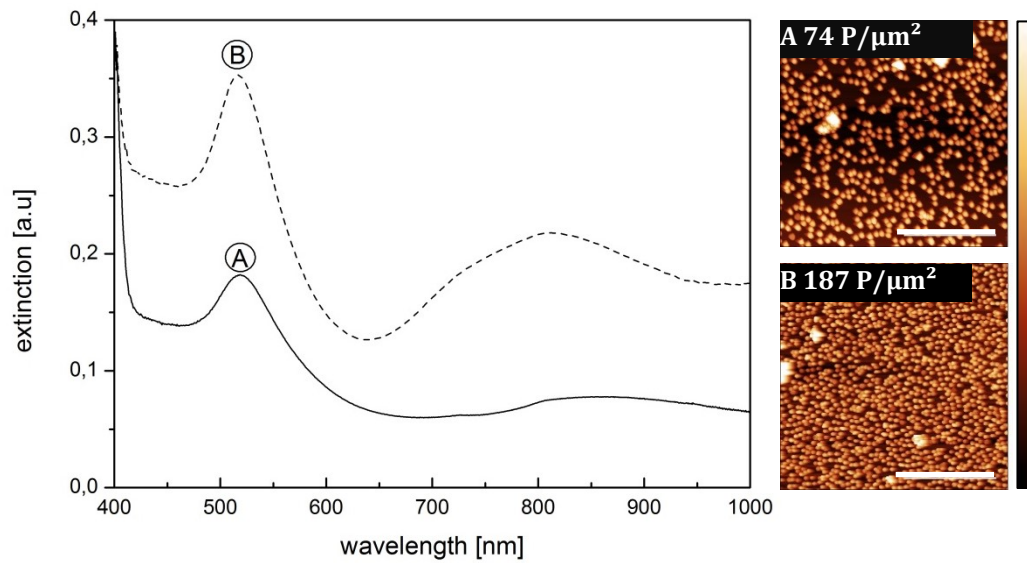
**Abbildung 9 | Bulksensitivitäten verschiedener plasmonischer Nanopartikel** Relative LSPR-Verschiebung in Abhängigkeit des refraktiven Index von sphärischen Goldnanopartikeln mit einem Durchmesser von 80-250 nm inklusive Standardabweichung (links) und formanisotropen Nanopartikeln (Ag triangles/Au cubes/Au stars) mit beispielhaften TEM/REM-Aufnahmen (rechts).

Die sphärischen Goldnanopartikel mit dem Durchmesser von 80 bis 150 nm (Au 80/100/150) weisen eine Bulksensitivität von 64 - 67 nm/RIU bei geringer Standardabweichung auf. Erst ab einer Größe von 200 nm Durchmesser (Au 200) erhöht sich die Bulksensitivität signifikant auf 133 nm/RIU und bei 250 nm Durchmesser (Au 250) auf 217 nm/RIU.

Formanisotrope Nanopartikel weisen eine höhere Bulksensitivität aufgrund der scharfen Kanten auf, an denen die elektrischen Felder verstärkt werden. Im Vergleich mit sphärischen Goldnanopartikeln (Au 80) besitzen Goldnanowürfel mit einer Kantenlänge von 50 nm (Au cubes) mit 126 nm/RIU ungefähr die doppelte, Goldnanosterne mit dem Außenmaß von 80 nm (Au stars) mit 189 nm/RIU die dreifache und Silbernanodreiecke mit einer Kantenlänge von 50 nm (Ag triangles) die vierfache Bulksensitivität. Solche Geometrien ermöglichen höhere Amplituden der Elektronenwolkenoszillation. Dabei sind die Goldnanosterne aufgrund ihrer zahlreichen und scharfen Spitzen 50 % sensitiver als die Goldnanowürfel, welche mit acht Ecken und zwölf Kanten mehr gerade Fläche und weniger scharfe Kanten aufweisen und damit geometrisch der Kugel ähnlicher sind. Nicht nur die Größe, Form und Material der Nanopartikel beeinflussen die Sensorperformance, auch die Verteilung der jeweiligen Nanopartikel auf dem Glassubstrat ist von Bedeutung.

Die folgende Abbildung 10 zeigt die Abhängigkeit der Extinktion von der Belegungsichte, welche mittels Rasterkraftmikroskopie (AFM, *atomic force microscopy*) ermittelt wurde. Beide Substrate unterscheiden sich nur in der Belegungsichte, wobei Substrat A 74 Partikel/ $\mu\text{m}^2$  und Substrat B 187 Partikel/ $\mu\text{m}^2$  aufweisen. Die Maxima beider Spektren liegen auf derselben Wellenlänge

(530 nm), unterscheiden sich jedoch in der Extinktion. Die 2,5-fach höhere Belegungsichte bei Substrat B induziert eine Steigerung der Extinktion von 0,19 (Substrat A) auf 0,35 (Substrat B).



**Abbildung 10 | LSPR-Spektrum in Abhängigkeit der Belegungsichte mit Au 80** Extinktion in Abhängigkeit der Wellenlänge von Substrat A mit einer Belegungsichte von  $74 \text{ P}/\mu\text{m}^2$  und Substrat B mit  $187 \text{ P}/\mu\text{m}^2$  inklusive AFM-Aufnahmen (Maßstab:  $2 \mu\text{m}$ , Höhenskala:  $120 \text{ nm}$ ) der Substrate.

## 3.1.2 M1 – LSPR-Detektion von Nukleinsäuren auf Nanopartikel-Monolayer



## Chapter 11

## LSPR Detection of Nucleic Acids on Nanoparticle Monolayers

Sophie Thamm, Andrea Csàki, and Wolfgang Fritzsche

## Abstract

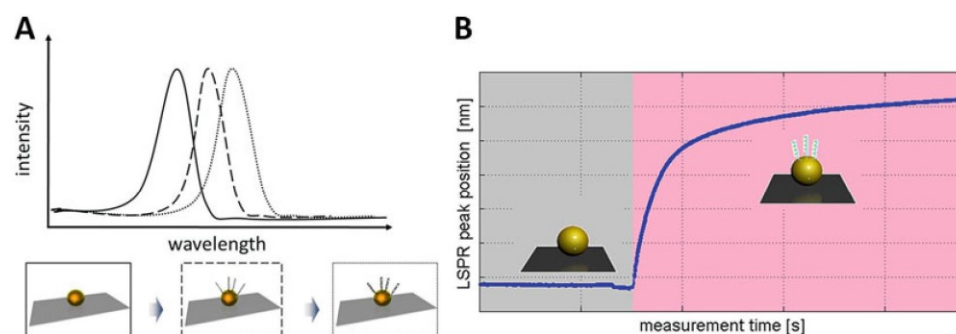
Noble metal nanoparticles are well known for their unique optical properties. Density oscillations of the nanoparticle conduction electrons are induced at a specific frequency by an external incident light beam. This phenomenon is known under the term localized surface plasmon resonance (LSPR). The spectral position of the resonance band is determined by shape, size, and material of the nanoparticle and influenced by changes of the local refractive index of the surrounding medium. The latter gives the opportunity to use noble metal nanoparticles as label-free bioanalytical sensors. Biomolecules can be bound directly on the nanoparticle surface, which leads to a change of the local refractive index, and a shift of the peak maximum is detected by absorbance spectroscopy. This method is used for bioanalytical diagnostics. Here, a DNA sensing protocol for real-time measurements in situ using this system will be presented. A dense layer of noble metal nanoparticles is immobilized on a glass substrate and implemented in a microfluidic chamber, where the spectroscopic measurements are conducted.

**Key words** Nanoparticles, Localized surface plasmon resonance, DNA, Detection, Bioanalytical diagnostic

## 1 Introduction

Detection of biomolecular binding, of the adsorption of thin biofilms or of conformational changes of macromolecules is of high interest in various branches of biology, medicine and pharmacy. One possible detection method is based on the optical spectroscopy of metallic nanostructures exhibiting localized surface plasmon resonances. It represents a label-free approach, with rather high sensitivity in comparison to other label-free techniques [1]. The occurring resonance band is sensitive to changes of the surrounding medium, which gives the opportunity to utilize them as label-free bioanalytical sensors. Biomolecules binding on the nanoparticle surface lead to a change of the local refractive index, which results in a shift of the peak wavelength [2, 3]. Due to the strong confinement of the electromagnetic field around the nanoparticles surface,



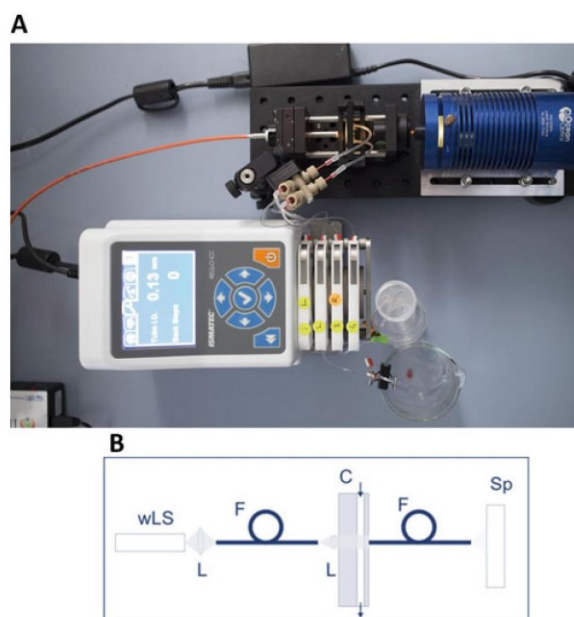


**Fig. 1** (a) Principle of LSPR DNA biosensing. Naked particles (left) are modified with single-stranded DNA (capture or receptor) of a specific DNA sequence complementary to the target (analyte) DNA (center). When the target DNA is present, it will bind on these capture-DNA-modified particles (right). The respective spectra are shown; capture DNA leads to a red-shift, the additional binding of the target DNA to another shift. (b) Real-time detection of the resonance wavelength shift caused by binding of the capture DNA on the particle surface

high surface sensitivities for small biomolecules can be achieved. The detection of such small biomolecules, here DNA, is based on a specific biomolecule–biomolecule interaction. The adsorption of thiolated oligonucleotides (around 20–25 nt), named capture DNA, on spherical gold nanoparticles leads to a first, and the following hybridization with the complementary target DNA to a second shift in the LSPR wavelength (*see* Fig. 1). In biosensing, the first step results in a biosensor (a sensor functionalized with a molecule that binds specifically to the target molecules, acting as receptor or capture). The second step represents the biosensing, the detection of the analyte molecule.

The measurement setup, named ensLSPR (ensemble of nanoparticles), consisting of a microfluidic pump, a tungsten light source, a spectrometer, two optical fibers and a microfluidic chamber is shown in Fig. 2. Both the biofunctionalization of the gold nanoparticles with capture DNA and the binding of the target DNA are performed under fluid flow conditions. The extinction spectra of the nanoparticle layers are measured continuously, which leads to a real-time tracing of the maximum peak position change. This allows the characterization of the different steps of the sensor preparation, as well as the subsequent sensing, and therefore it additionally yields kinetic information.

The online detection is controlled by a custom-built LabView program (LabView 8.6). A spectrum is recorded continuously (every 2 s). In order to minimize the noise of position of the LSPR peak, the centroid of the LSPR peak is calculated as described in ref. [4].



**Fig. 2** (a) EnsLSPR setup (b) Scheme of the measurement setup, *wLS* white light source, *L* lens, *F* fiber, *C* flow chamber, *Sp* spectrometer

## 2 Materials

All solutions should be prepared using ultrapure water (e.g., MilliQ,  $>18 \text{ M}\Omega \text{ cm}$  at  $25^\circ\text{C}$ ).

### 2.1 Cleaning of Glass Slides

1. Glass slides.
2. Alkaline remover (rinsing agent like Palmolive, Fit).
3. Acetone, Rotisol (Carl Roth, Germany), ethanol, and ultrapure water.

### 2.2 Silanization

1. 1% (3-aminopropyl)triethoxysilane (APTES) in 1 mM acetic acid. This must be prepared between 10 and 15 min before its use, to achieve a controlled partial hydrolysis of APTES.

### 2.3 Immobilization of Gold Nanoparticles

1. APTES-coated glass slides.
2. Gold nanoparticles (BBI Solutions, Cardiff, UK): 80 nm in diameter,  $1.10 \times 10^{10}$  particles/ml ( $\text{OD}_{525} = 1.0$ ) (see Note 1).

## 2.4 DNA Detection

1. 26-nt oligonucleotide as capture DNA with the sequence of 5'-TCAAAGTAAAAAGTCCTGGTTCGCCAT-3', thiol C6 at 5' ([biomers.net](http://biomers.net), Germany) (*see Note 2*).
2. 26-nt oligonucleotide as target DNA with the sequence of 5'-ATGGCGAACCAGGACTTTTACTTTGA-3' from [biomers.net](http://biomers.net) GmbH ([biomers.net](http://biomers.net), Germany).
3. CB buffer (adsorption buffer): 0.5 M trisodium citrate-dihydrate, pH 3.0 by HCl [5] (*see Note 1*).
4. Running buffer (5× SSC): 0.75 M NaCl, 75 mM trisodium citrate, pH 7.0 with HCl (*see Note 1*).
5. 1 mM 6-mercapto-1-hexanol (MCH) in ultrapure water (*see Note 3*) [6, 7].
6. 0.1 M NaOH [8] (*see Note 3*).

## 2.5 Equipment

1. Centrifuge (UniCen 15DR by *Herolab GmbH*, Wiesloch, Germany).
2. Oxygen plasma etcher (200G Plasma System by *TePla GmbH*, Wetztenberg, Germany).
3. Halogen light source (HL-2000 by *Ocean Optics*, Dunedin, USA) with a filter <400 nm.
4. Spectrometer (Cypher II by *B&W Tek Inc.*, Newark, USA).
5. Pump (Ismatec Reglo ICC by *Cole-Parmer GmbH*, Wertheim, Germany).
6. Two optical large-core fibers.
7. ensLSPR fluidic cell (custom made). Microfluidic tubings should be kept as short as possible to avoid extensive diffusion of analyte solutions.

---

## 3 Methods

The first objective is a thorough cleaning of the glass slides. To increase the affinity of the gold nanoparticles to the glass surface, the glass slides are functionalized with amine groups. Therefore, a wet chemical silanization is used [9, 10]. The third step is the immobilization of the gold nanoparticles. After this procedure, the sensor is finished and ready for the measurement—the detection of DNA—based on LSPR.

### 3.1 Cleaning of Glass Slides

1. Clean the glass slides with rinsing agent and further with acetone, Rotisol, ethanol and ultrapure water in ultrasonic bath for 10 min each.
2. Dry the slides with a flow of nitrogen gas.
3. Etch the slides by oxygen plasma for 60 min, 380 W and 1.6 mbar. This procedure removes organic adsorbates and thereby activates the glass slides for the silanization.

### 3.2 Silanization

In order to increase the affinity of the gold nanoparticles to the glass surface the glass slides are functionalized with aminosilane.

1. Treat the cleaned slides with 1% APTES in 1 mM acetic acid for 10 min.
2. Wash the slides with ultrapure water.
3. In case of immediate use, treat the slides for 2 min in an ultrasonic bath with ultrapure water and dry under a nitrogen flow.
4. For storage, dry the slides with nitrogen and store under argon (for subsequent use, execute **step 3** above).

### 3.3 Immobilization of Gold Nanoparticles

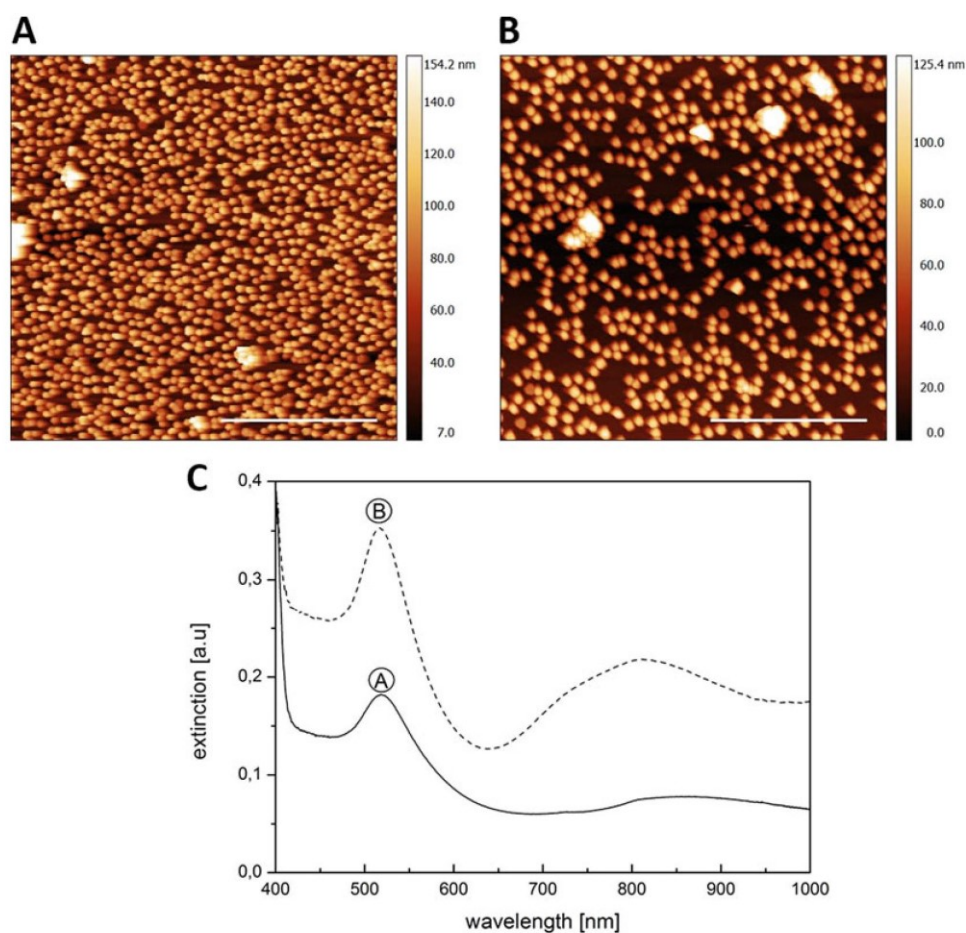
1. Centrifuge 2 ml of 80 nm gold nanoparticles for 8 min at  $3220 \times g$ .
2. Discard the supernatant (in our case 1900  $\mu\text{L}$  for 20-fold concentration).
3. Resuspend the nanoparticles in ultrapure water. (At this step, they should be at about 20-fold concentration with respect to the commercial preparation.).
4. Incubate a 20  $\mu\text{L}$  drop of the 20-fold concentrated gold nanoparticle solution for 60 min on the APTES coated glass slide. The drop should be carefully laid (and confined) in the area where the nanoparticle film is desired to form (*see Note 4*).
5. Gently wash the slides with ultrapure water and gently dry them with nitrogen. *See Fig. 3* for atomic force microscopy (AFM) images of the rather dense nanoparticle layer and the corresponding spectra.

### 3.4 DNA Detection

The peristaltic pump is used at a flow rate of 20  $\mu\text{L}/\text{min}$  throughout the procedure.

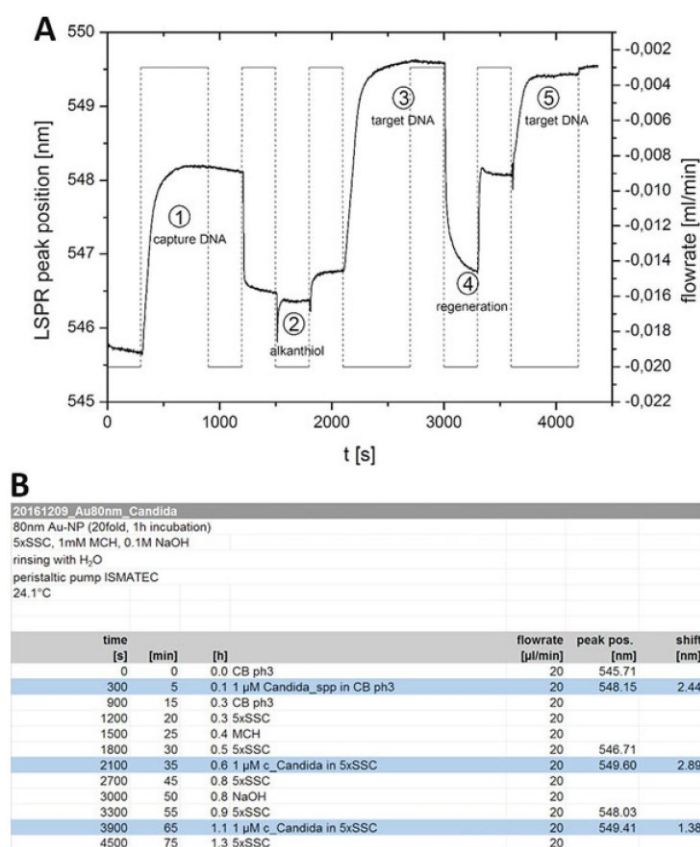
1. Activate and clean the chip by oxygen plasma etching for 10 s at 1.6 mbar and 380 W.
2. Assemble the measurement system with the activated slide in the fluidic chamber.
3. Pump CB buffer (adsorption buffer) into the chamber (*see Note 5*).





**Fig. 3** Atomic force microscopy (scale bar 2 μm) of the sensor substrates with immobilized 80 nm gold nanoparticles for different incubation time (**a**: 10 min incubation, **b**: 60 min incubation) and the corresponding spectra (**c**)

4. Inject 1 μM thiolated capture DNA in CB buffer for at least 5 min. The adsorption of thiolated DNA commonly causes a wavelength shift of a few nm (typically 2–3 nm; 2.44 nm in the shown measurement) in the adsorption spectrum.
5. Change the CB buffer with running buffer (5× SSC) (*see Note 5*).
6. Inject 1 mM MCH in ultrapure water into the chamber until the signal is stable, 5 min should be enough. The MCH co-adsorbs with the thiolated capture DNA on the gold nanoparticle surface in order to improve the hybridization yield. The particle surface is thereby covered and so passivated against nonspecific adsorption of DNA (i.e., along the strands) (*see Note 6*).



**Fig. 4** EnsLSPR sensing measurement. (a) (1) adsorption of capture DNA  $\Delta\lambda = 2.44$  nm, (2) coadsorption with MCH, (3) hybridization with target DNA  $\Delta\lambda = 2.89$  nm, (4) regeneration with NaOH, (5) 2nd hybridization with the target DNA  $\Delta\lambda = 1.38$  nm. (b) Description of the corresponding protocol and results, as from the instrument software

- Inject  $1 \mu\text{M}$  complementary target DNA in running buffer ( $5 \times \text{SSC}$ ) until the signal reaches a plateau, at least 15 min. Binding of covalent DNA should lead to a wavelength shift of a few nanometers (typically 2–3 nm; 2.89 nm in the shown measurement) in the adsorption spectrum (*see Note 6*).
- Regenerate the sensor by flowing 0.1 M NaOH. This destroys the hydrogen bonds between the bases, and thereby removes the target DNA specifically. A new binding experiment is now possible. A complete measurement procedure is shown in Fig. 4.

## 4 Notes

1. Every buffer and the gold nanoparticle solution should be filtered (with a 0.22  $\mu\text{m}$  pore filter).
2. The thiol group of the capture DNA has to be intact. It is important that the DNA forms no hairpins. In the first case the adsorption and in the second case the hybridization will be seriously hampered or even fail.
3. The MCH and NaOH solutions need to be prepared fresh. Their state is crucial for the success of the method.
4. A 20-fold concentration of the gold nanoparticle stock solution is recommended. The resulting spectra show a high intensity that leads to optimal measurements. Nevertheless, it is possible to measure with a lower concentration of nanoparticles. That applies to the incubation time too. An incubation time of 60 min is recommended. The spectrum shows a lower intensity for lower incubation times, and the monolayer of the gold nanoparticles is not as dense as after a 60 min incubation.
5. Dilution and running buffer should be the same, otherwise the refractive index of the solution will change and so impede the measurement.
6. The necessary volumes of the solutions depend on chamber-thickness, tube diameter and flow rates.

## Acknowledgments

We thankfully acknowledge Jacqueline Jatschka for further measurements as well as André Dathe and Ondrej Stranik for the data recording script and the setup. The funding of ExoDiagnos (EU Era-NET-AiFZIM KF2206925CR4) and TRACE (EU Era-NET-KIT 02WU1348A) is gratefully acknowledged.

## References

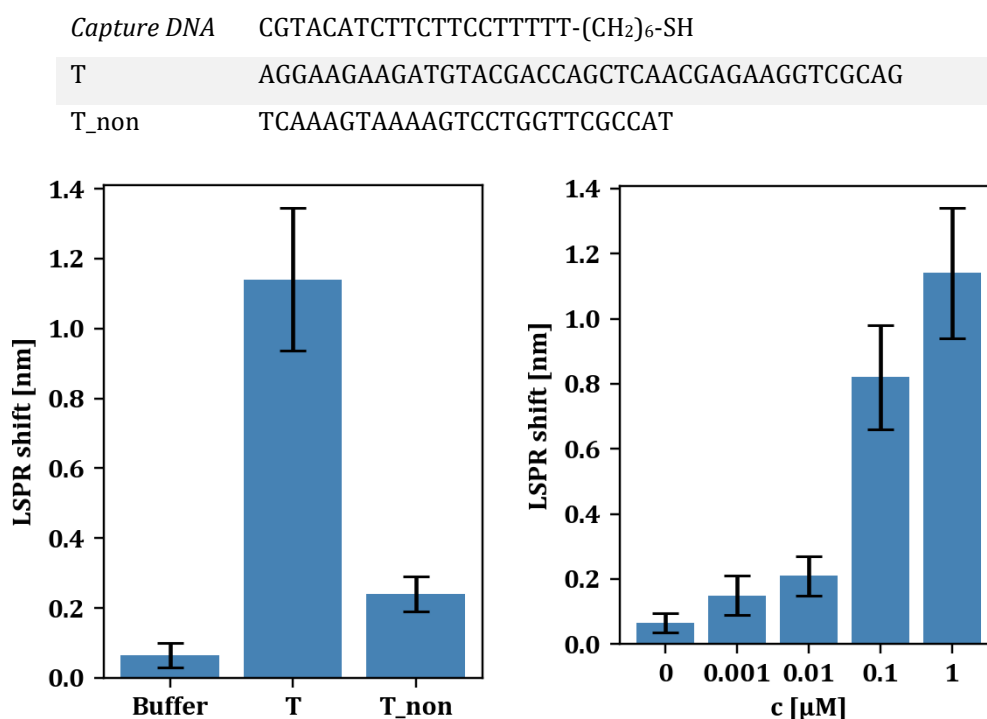
1. Kreibitz U, Vollmer M (1995) Optical properties of metal clusters, Series in materials science, vol 25. Springer, Berlin
2. Schneider T, Jahr N, Jatschka J, Cs  ki A, Stranik O, Fritzsche W (2013) Localized surface plasmon resonance (LSPR) study of DNA hybridization at single nanoparticle transducers. *J Nanopart Res* 15(4):1–10. <https://doi.org/10.1007/s11051-013-1531-7>
3. Jatschka J, Dathe A, Cs  ki A, Fritzsche W, Stranik O (2016) Propagating and localized surface plasmon resonance sensing—a critical comparison based on measurements and theory. *Sens Bio-Sensing Res* 7:62–70. <https://doi.org/10.1016/j.sbsr.2016.01.003>
4. Dahlin AB, Tegenfeldt JO, H    k F (2006) Improving the instrumental resolution of sensors based on localized surface Plasmon resonance. *Anal Chem* 78(13):4416–4423. <https://doi.org/10.1021/ac0601967>
5. Zhang X, Servos MR, Liu J (2012) Instantaneous and quantitative functionalization of gold nanoparticles with thiolated DNA using a pH-assisted and surfactant-free route. *J Am Chem Soc* 134(17):7266–7269. <https://doi.org/10.1021/ja3014055>

6. Herne TM, Tarlov MJ (1997) Characterisation of DNA probes immobilized on gold surfaces. *J Am Chem Soc* 119:8916–8920
7. Levitsky R, Herne TM, Tarlov MJ, Satija SK (1998) Using self-assembly to control the structure of DNA monolayers on gold: a neutron reflectivity study. *J Am Chem Soc* 120:9787–9792
8. Dupont-Filliard A, Billon M, Livache T, Guilleret S (2004) Biotin/avidin system for the generation of fully renewable DNA sensor based on biotinylated polypyrrole film. *Anal Chim Acta* 515(2):271–277. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2004.03.072>
9. Fang Y, Hoh JH (1998) Surface-directed DNA condensation in the absence of soluble multivalent cations. *Nucleic Acids Res* 26(2):588–593
10. Csáki A, Jahn F, Latka I, Henkel T, Malsch D, Schneider T, Schröder K, Schuster K, Schwuchow A, Spittel R, Zopf D, Fritzsche W (2010) Nanoparticle layer deposition for plasmonic tuning of microstructured optical fibers. *Small* 6(22):2584–2589. <https://doi.org/10.1002/sml.201001071>



### 3.1.3 Detektionslimit des Sensors

Anhand eines Modellsystems wurde die Spezifität und Sensitivität des Biosensors evaluiert (Abbildung 11). Im Gegensatz zum vorherigen Kapitel wurden Substrate mit geringer Belegungsdichte, die Über-Nacht-Inkubation der *capture DNA* und 20 mM HCl als Regenerationschemikalie verwendet. Die Ursachen der geringeren Signaländerungen wurden untersucht, konnten jedoch nicht abschließend geklärt werden.



**Abbildung 11 | Spezifität und Sensitivität des Biosensors anhand eines Modellsystems** Relative Centroidverschiebung mit Standardabweichung durch Puffer, Target und nichtkomplementäres Target bei gleichbleibender Konzentration von 1 μM (links), Centroidverschiebung mit Standardabweichung durch verschiedene Konzentrationen (0-1 μM) des Targets (rechts), N = 3.

Die Spezifität des Biosensors (Abbildung 11 links) wurde folgendermaßen bestimmt: zuerst erfolgte eine Anbindung von 1 μM thiolmodifizierter *capture DNA* über Nacht und anschließend eine Implementierung des funktionalisierten Substrates in die mikrofluidische Kammer. Für die Messung wurde das Target in äquimolarer Konzentration im Fluss zugegeben und der Biosensor mit HCl (20 mM) regeneriert (N = 3). Das Signal für das unspezifische Target (T<sub>non</sub>) beträgt mit 0,2±0,1 nm ca. 21 % des spezifischen Targets mit 1,1±0,2 nm. Die Negativkontrolle (Buffer) erzeugt mit 0,06±0,03 nm nur ein sehr geringes Signal.

Das Ziel der Biosensorik ist der Entwurf spezifischer und sensibler Sensoren für den Nachweis sehr geringer Mengen des Biomarkers/Pathogens. Abbildung 11 rechts zeigt die Sensitivität des Modells für Konzentrationen zwischen 0 – 1 μM des Targets. Hierbei wurden folgende Signale gemessen: 0,06±0,03 nm für Puffer, 0,15±0,06 für 0,001 μM, 0,21±0,06 nm für 0,01 μM, 0,82±0,16 nm für 0,1 μM und 1,14±0,20 nm für 1 μM Target. Die Verschiebung der Peakposition

vergrößert sich mit zunehmender Targetkonzentration, das System ist demnach quantitativ und korreliert mit der Konzentration des Targets.

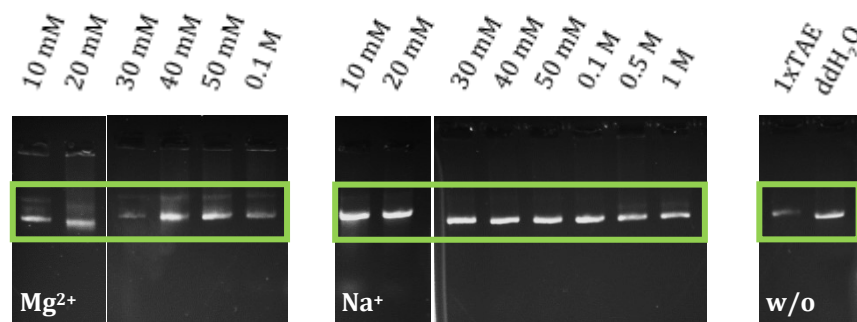
Zur Bestimmung der Sensitivität eines Sensors wurde das Detektionslimit (*limit of detection*, LOD) bestimmt. Bei der LOD handelt es sich um die niedrigstmögliche Konzentration, bei der die Methode das Target innerhalb der Matrix mit einem gewissen Vertrauensgrad nachweisen (aber nicht mehr quantifizieren) kann und ist demzufolge definiert als die niedrigste Konzentration, die sich mit gewisser Zuverlässigkeit vom Hintergrundrauschen abhebt. Die Bestimmung der LOD kann visuell, durch Bestimmung des Signal-Rausch-Verhältnisses und mittels Standardabweichung berechnet werden. Letzteres ist für instrumentelle Methoden geeignet. Die Blindwertbestimmung wird angewendet, wenn die Blindwertanalyse (Puffer) Ergebnisse mit einer Standardabweichung ungleich Null ergibt. Die LOD wird als die Analytkonzentration angenommen, die dem Probenleerwert plus dreimal Standardabweichungen entspricht.<sup>103</sup> Diese Kalkulation ergibt einen Wert von 0,17 nm. Durch Verbindung der Messpunkte entspricht dies einer LOD von 4,1 nM.

### 3.2 DNA-Überstrukturen für die Sensoroptimierung

Aktuelle LSPR-basierte Sensoren sind günstig, robust und markierungsfrei, leiden jedoch an geringen Sensitivitäten. Da die Stärke des Signals vom elektromagnetischen Feld des Nanopartikels und vom Umgebungsmedium abhängt, können hier Signalverstärkungsmethoden ansetzen. Die DNA-Nanotechnologie ermöglicht hier gerichtete Resonanzkopplung durch die Anordnung der Transducer und die Signalverstärkung durch Amplifikation.

#### 3.2.1 Stabilität von DNA-Origami in Lösung und Immobilisierung auf Glimmer

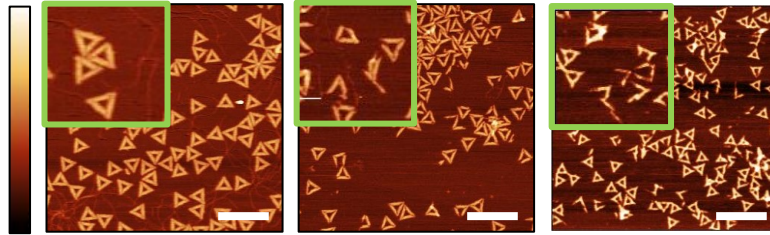
Die flexible und präzise Immobilisierung selbstorganisierender DNA-Nanostrukturen ist ein wichtiger Schritt für die Integration von DNA-basiertem Material für potenzielle sensorische Anwendungen. Hierfür ist die Stabilität und die Immobilisierung der DNA-Origami, welche typischerweise in einem 1xTAE-Puffer mit 10-12,5 mM Magnesiumchlorid synthetisiert werden, von entscheidendem Interesse. Es wurde sowohl die Stabilität in Lösung als auch die anschließende Immobilisierung auf Glimmer in Abhängigkeit verschiedener ionischer Pufferzusammensetzung untersucht, um eine intakte und stabile Anordnung der DNA-Origami für eine spätere Funktionalisierung mit Nanopartikeln zur gerichteten Resonanzkopplung zu ermöglichen. Die DNA-Origami (finale Konzentration von 5 nM) wurden in 1xTAE-Puffer mit 10 mM  $\text{MgCl}_2$  synthetisiert, gefiltert und in 1xTAE-Puffer mit verschiedenen Konzentrationen an Magnesium und Natrium umgepuffert. Die Abbildung 12 zeigt das zugehörige Gelbild.



**Abbildung 12 | Gelelektrophorese von DNA-Origami in variierender Ionenkonzentration** DNA-Origami mit einer  $\text{Mg}^{2+}$ -Konzentration von 10-100 mM (links),  $\text{Na}^+$ -Konzentration von 10-1000 mM (mittig) und ohne Ionen in 1xTAE-Puffer und ddH<sub>2</sub>O (rechts) im 0,75 % -igen Agarosegel in 1xTAE-Laufpuffer mit 10 mM  $\text{MgCl}_2$ .

Bis auf die Probe mit 30 mM  $\text{MgCl}_2$  und ohne  $\text{MgCl}_2$  in 1xTAE-Puffer sind alle Banden stark ausgeprägt, weisen dieselbe DNA-Struktur auf und sind demnach stabil und richtig gefaltet. Abbildung 13 zeigt AFM-Aufnahmen von DNA-Origami immobilisiert auf Glimmer. Die DNA-Origami weisen dabei folgende  $\text{Mg}^{2+}$ -Konzentration auf: 10, 20 und 40 mM. Bei 10 mM  $\text{Mg}^{2+}$  liegen die DNA-Origami strukturell intakt vor. Im Gegensatz dazu ist zu beobachten, dass die erhöhte Magnesiumkonzentration ab 20 mM DNA-Origami auf Glimmer destabilisiert und final zerstört. Bei der

höchsten  $\text{Mg}^{2+}$ -Konzentration von 1 M sind keine DNA-Origami mehr auf der Oberfläche zu detektieren.



**Abbildung 13 | AFM-Aufnahmen von DNA-Origami auf Glimmer** DNA-Origami mit 10 mM (links), 20 mM (mittig) und 40 mM (rechts)  $\text{Mg}^{2+}$ ; Maßstab: 500 nm, für Details: 100 nm und Höhenskala: 4 nm.

### 3.2.2 M2 – AFM-basierte Untersuchung der Flexibilität und Oberflächenanhaftung von immobilisierten DNA-Origami

LANGMUIR

Cite This: Langmuir XXXX, XXX, XXX–XXX

Article

pubs.acs.org/Langmuir

## AFM-Based Probing of the Flexibility and Surface Attachment of Immobilized DNA Origami

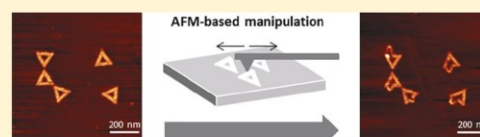
Sophie Thamm,<sup>†</sup> Nicole Slesiona,<sup>†</sup> André Dathe,<sup>†,‡</sup> Andrea Csáki,<sup>†</sup> and Wolfgang Fritzsche<sup>\*,†</sup>

<sup>†</sup>Leibniz-Institute of Photonic Technology, 07745 Jena, Germany

<sup>‡</sup>Jena University Hospital, Friedrich-Schiller-University, 07745 Jena, Germany

**S** Supporting Information

**ABSTRACT:** The flexible and precise immobilization of self-organizing DNA nanostructures represents a key step in the integration of DNA-based material for potential electronic or sensor applications. However, the involved processes have still not been well studied and are not yet fully understood. Thus, we investigated the potential for the mechanical manipulation of DNA origami by atomic force microscopy (AFM) in order to study the interaction between intramolecular flexibility and surface-attachment forces. AFM is particularly suitable for nanoscale manipulation. Previous studies showed the potential for pushing, bending, and cutting double-stranded DNA (dsDNA) with an AFM tip. Understanding the involved parameters may enable control over different processes such as nanointegration, precise cutting, and stretching of preassembled DNA origami. We demonstrate the defined manipulation and flexibility of DNA origami immobilized on mica in the nanometer range: controlled cutting, folding, and stretching as a function of the magnesium concentration.



### ■ INTRODUCTION

The observation and manipulation of nanometer-scale objects, single molecules, and individual atoms are key elements in nanoscience and nanotechnology, not only at the ultimate resolution limit as the manipulation of single atoms demonstrated by STM in 1982.<sup>1</sup> Atomic force microscopy (AFM) allows measurements of nanoscale objects with very high local resolution with an undisputed versatility of variety of measurable parameters, which cover morphological features such as topography, texture, and crystallinity to material properties such as electrical conductivity, magnetism, elasticity, and many others.<sup>2</sup> Moreover, it can be utilized for mechanical nanoscale manipulation by selective pushing, scratching, and folding with the AFM tip apex.<sup>3</sup> So far, this technique has been utilized for the manipulation of nanostructures such as carbon nanotubes<sup>4,5</sup> and nanoparticles<sup>6</sup> and for the creation of nanoparticle hybrid structures.<sup>7</sup>

Using biological materials as building blocks represents a promising approach to overcoming the technical limitations of top-down approaches and to establishing novel bottom-up techniques. Nowadays, DNA is one of the most useful engineering materials available in nanotechnology. Besides its genomic information, DNA exhibits very interesting biophysical and physicochemical properties such as biological function, biocompatibility, molecular recognition capacity, and nanoscale addressability. Scientists have utilized DNA beyond its genetic role to prepare a multiplicity of materials associated with a wide range of applications.<sup>8,9</sup> Therefore, cutting<sup>10–12</sup> and stretching<sup>13</sup> dsDNA and other biological materials<sup>14</sup> by AFM were investigated.

Furthermore, DNA has the potential for self-assembly and the formation of programmable nanostructures.<sup>15–18</sup> In particular, DNA origami, the most well known DNA self-assembling technique for realizing nanoscale 2D and 3D structures,<sup>16</sup> provides a potential platform for mechanical, chemical, and optical devices such as DNA wires, transistors, capacitors, and others.<sup>19–22</sup>

Bridging the gap between synthesis and the application of these structures is one aim of DNA-based nanotechnology. In this context, the integration and investigation of these structures adsorbed on a mica surface is of interest because, as the best-established DNA immobilization surface, it offers a variety of benefits such as biocompatibility and easy cleavage along its planes, resulting in a clean and atomically smooth surface.<sup>23</sup> Moreover, it is chemically quite inert,<sup>23</sup> and by increasing the incubation time and adding plasma treatment,<sup>24</sup> the experiments could be transferred to smooth silicon surfaces, which are technologically more relevant.

However, the processes involved in morphological alterations of complex DNA structures, especially in combination with surface attachment, such as DNA origami are still not fully understood. Divalent cations such as magnesium are the basis of DNA absorption on mica as a standard substrate by mediating the binding between both the negatively charged mica surface and the phosphate backbone of the DNA.<sup>25–27</sup>

**Special Issue:** Nucleic Acids Nanoscience at Interfaces

**Received:** July 16, 2018

**Revised:** September 5, 2018

**Published:** September 25, 2018

ACS Publications © XXXX American Chemical Society

A

DOI: 10.1021/acs.langmuir.8b02362  
Langmuir XXXX, XXX, XXX–XXX



The binding of DNA on mica under fluid conditions can therefore be adjusted by varying the concentration of these cations.<sup>28</sup> Furthermore, magnesium ions stabilize double-stranded DNA structures at physiological levels, whereas they destabilize them at lower as well as higher concentrations.<sup>29</sup> Additionally, magnesium ions are known to stabilize end-to-end interactions of sticky-ended DNA structures;<sup>30</sup> therefore, they are usually present in the DNA origami synthesis buffer.<sup>16</sup>

Studies of DNA origami kinetics and the influence of key parameters usually rely on technologies such as the fluorometric determination of already-assembled parts.<sup>31</sup> Also, thermally controlled AFM combined with force spectroscopy was applied in order to follow the assembly of DNA origami nanopores.<sup>32</sup> These studies are usually aimed at the assembly process, monitoring the formation of DNA–DNA complexes. An opposite approach was studied by utilizing the mechanical unzipping of individual origami using an AFM tip to grab and pull the underlying DNA backbone, thereby aiming at the characterization of the stability of DNA origami.<sup>33</sup> On the contrary, the strength of DNA–substrate interactions is adjusted in order to induce a certain surface mobility of DNA origami, resulting in rearrangements and dense packing of the superstructures.<sup>34–36</sup> This is often realized by variations in the ion concentration of the buffer, especially the ratio between  $\text{Na}^+$  and  $\text{Mg}^{2+}$ .

To study the interplay between the adsorption strength of the DNA superstructures to the substrate and the intramolecular integrity, AFM-based nanoscale mechanical manipulation is used. The AFM tip is utilized in order to (re)move parts of the immobilized structure prior to imaging any induced changes. By varying adsorption parameters such as the concentration of the magnesium ions, the observed effect on the manipulation should provide insights into the involved processes.

## EXPERIMENTAL SECTION

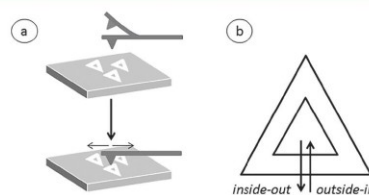
All chemicals were purchased from Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Taufkirchen, Germany) unless otherwise noted. Linear double-stranded bacteriophage lambda DNA ( $\lambda$ -DNA) (cd857 Sam7 by Thermofisher, Waltham, MA) was used at a final concentration of 0.02 ng/ $\mu\text{L}$  in 2 mM  $\text{MgCl}_2$ .

**DNA Origami Synthesis.** The rectangular DNA origami is a prefabricated design (Flat sheet–staple mixture) by Tilbit Nanosystems GmbH (Garching, Germany) and was assembled as stated in the appended protocol. The triangular DNA origami was assembled in 1× TAE buffer (40 mM Tris-HCl, 20 mM acetic acid, 2 mM EDTA at a final pH of 8) with 10 mM  $\text{MgCl}_2$ . *M13mp18* (5 nM, Tilbit Nanosystems GmbH, Garching, Germany) was used as a scaffold, and 150 nM per staple (Metabion International AG, Planegg/Steinkirchen, Germany) was chosen as published.<sup>16,37</sup> The samples were incubated in an Eppendorf mastercycler gradient (Eppendorf AG, Hamburg, Germany) with a temperature ramp from 95 to 25 °C at 1 K/min, resulting in an assembly time of about 70 min.<sup>36</sup> To investigate the effect of different  $\text{Mg}^{2+}$  concentrations on the absorption behavior of DNA origami, the DNA origami was diluted to a final concentration of 0.5 nM *M13mp18* in either 1× TAE or DEPC-water. To remove the  $\text{Mg}^{2+}$ , the sample was bufferexchanged four times in DEPC-water using Amicon Ultra 0.5 mL centrifugal filters (Merck KGaA, Darmstadt, Germany).

**Immobilization of DNA/DNA Origami.** First, the mica surface (Plano GmbH, Wetzlar, Germany) was cleaved and 3–5  $\mu\text{L}$  of DNA origami solution was immediately incubated for 2 min as a droplet. Subsequently, the substrate was rinsed with 200  $\mu\text{L}$  of ethanol or ddH<sub>2</sub>O and dried gently in a flow of nitrogen. After incubation for 2 min,  $\lambda$ -DNA was stretched by blowing the drop off at a 45° angle using a flow of nitrogen. The  $\text{Mg}^{2+}$ -free DNA origami was incubated

and dried without rinsing. The samples were measured right after preparation.

**AFM Imaging and Nanomanipulation.** All images were collected in tapping mode in air with a Dimension Icon extended with the Bruker NanoMan software package (Bruker Corporation, Billerica, MA) with Tap300Al-G tips (300 kHz, 40 N/m, Budget-Sensors, Sofia, Bulgaria). Prior to the manipulation, an area with adsorbed DNA origami was localized and imaged by AFM. After scanning, the operation mode was changed to NanoMan, enabling the free positioning of the AFM tip in the  $x$ – $y$  direction by a mouse click on a previously taken image. Subsequently, the tip was lowered onto the surface to mechanically manipulate DNA origami. The manipulations were done as in Figure 1b in which one side of the



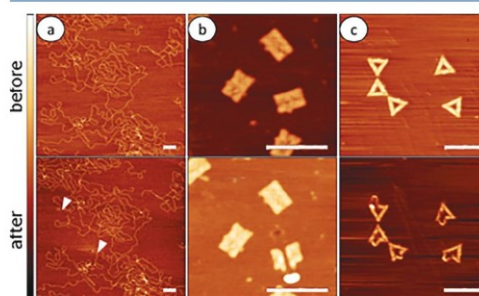
**Figure 1.** (a) Schematic representation of the manipulation on DNA origami with the atomic force microscopy tip. (b) Manipulation location and direction, resulting in an indentation (outside in) or stretching (inside out) of the processed side of the triangle.

triangle was selected and then the tip was positioned, either inside out or outside in, and moved perpendicularly through the structure. The manipulations were performed in contact mode. The chosen parameters for the nanomanipulation were  $xy$  velocity = 2  $\mu\text{m/s}$ , tip voltage = 0.0 V,  $z$  distance = –50 to –40 nm, and  $z$  velocity = 50 nm/s. The image resolution was 512 samples/line. Scratching distances were 44, 77, and 99 nm (Figure S11).

**Data Processing.** The raw data was processed with Gwyddion software (version 2.47)<sup>38</sup> using the following steps: level data by subtracting the average midlevel, align rows, correct horizontal error lines, and set the minimum value as the zero point. After the raw data were processed, the profiles were extracted and analyzed to evaluate the scratch distances (Figure S11).

## RESULTS AND DISCUSSION

The experimental nanomanipulation setup was established by starting with immobilized linear dsDNA. Samples of  $\lambda$ -DNA immobilized on mica were imaged with an AFM (Figure 2a,



**Figure 2.** AFM-based nanomanipulation of DNA-related structures (top, before manipulation; bottom, after manipulation): (a)  $\lambda$ -DNA, height scale 2 nm; (b) rectangular and (c) triangular origami, height scale 3 nm, scale bar of all images 200 nm.

B

DOI: 10.1021/acs.langmuir.8b02362  
Langmuir XXXX, XXX, XXX–XXX

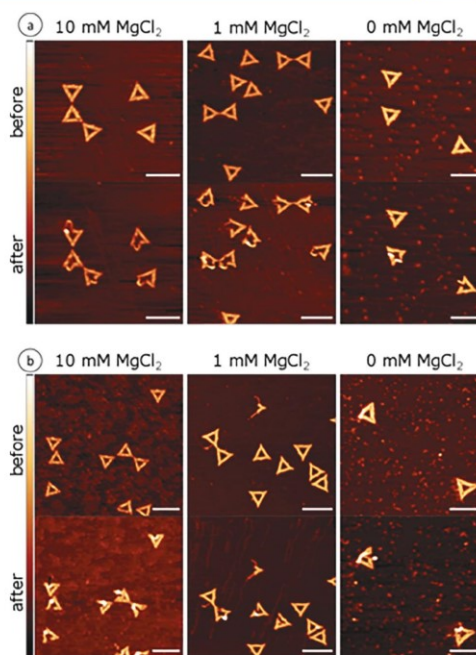
top). Suitable locations for manipulation were selected, as indicated by the arrowheads in Figure 2a, bottom, prior to targeting these locations by the AFM tip. Here, the AFM tip was moved along a predetermined path by a mouse click on the previously taken image. In the example shown in Figure 2, the tip is moved perpendicular through the adsorbed dsDNA in two different locations. Afterward, another image is taken, and Figure 2a (bottom) shows dsDNA cut at the desired locations. In this case, the substrate–DNA interaction seems stronger than the intramolecular forces inside the DNA double strand, resulting in rather clear cuts where the joining parts of the DNA remain firmly attached to the surface.

Extending the experiments to rectangular DNA origami results in cuts of approximately 15 nm in width in the immobilized origami structures (Figure 2b). The image indicates that DNA material is taken out of the DNA origami structure and pushed alongside the path of the AFM tip. It is then separated from the structure and left to accumulate where the tip movement stops beside the manipulated DNA origami, leaving two origami parts separated by a cut. This observation implies that the substrate attachment is quite strong in this geometry and is probably supported by the large contact area. To investigate the rigidity and flexibility of origami sections, we changed to the less compact and more delicately structured triangular DNA origami design with individual subparts separated from each other.

In the case of the triangular origami geometry (Figure 2c), the experiments succeeded in releasing parts of the origami structure temporarily from the substrate during pushing, which usually attach again in a changed, often stretched as well as elongated arrangement. In the shown experiments, the AFM tip was positioned at the midpoint of the triangle and then moved through the center perpendicular to the focused side of the DNA origami. The observed results indicate the elastic behavior of the DNA structures in certain limits, allowing the AFM tip to not only bend but also to overstretch and break the origami structure when using sufficiently larger distances. By applying defined distances of AFM tip movement, the resulting behavior of the targeted origami structures should reveal information about both the intramolecular origami stability and the mica surface attachment.

Note that in these experiments a systematic offset between the chosen and the experimentally observed distances is inherent as a result of the lateral image artifacts caused by the AFM tip apex. To account for the influence of this diameter, scratching of a PMMA substrate was performed to measure the actually obtained displacements on the substrate. The measured values are distances 1 (approximately 44 nm) and 2 (approximately 77 nm), whereas distance 3 (approximately 99 nm) was chosen as a positive control (distance reference; see Figure S11).

**Manipulation of Triangular Origami: Inside Out.** Hence, experiments were conducted with triangular origami offering a side length of about 127 nm. As for the experiments shown in Figure 2, the origami were adsorbed on mica and imaged with AFM. Selected structures were then manipulated using AFM-tip scratching, and finally, another AFM image of the same area was recorded in order to evaluate the results. In Figure 3a, a typical experiment according to this sequence is shown: in the top row, an AFM image of a selected surface region is shown, which was then used to select origami structures for tip manipulation. The bottom row depicts the same region recorded by AFM after manipulation. Similar to



**Figure 3.** AFM-based nanomanipulation of DNA origami on mica with 10, 1, and 0 mM  $\text{Mg}^{2+}$  concentrations. (a) DNA origami before (above) and after (below) the inside-to-outside manipulation and (b) DNA origami before (above) and after (below) the outside-to-inside manipulation. Scale bar, 200 nm; height scale, 3 nm.

Figure 2c, the AFM manipulation resulted in structural changes in the origami: All five visible origami exhibit a region which seems to be elongated and stretched to the outside and finally is pinned down to the substrate. However, in all cases the elongated origami is still intact, meaning that the structure was not dissected. Only in one case was a significant accumulation of material observed as a bright spot with a height of approximately 4 nm. Otherwise, the height of the manipulated and the unaffected origami parts, both approximately 2 nm, seems rather comparable (the height is brightness-coded as indicated by the bar at the left).

**Influence of Ionic Strength.** To study the influence of salt concentration on this AFM-based nanomanipulation process, the DNA origami solution was either diluted or rebuffed in ddH<sub>2</sub>O to final concentrations of 10, 1, and 0 mM  $\text{MgCl}_2$  prior to air drying, imaging, and manipulation (Figure 3a). Besides in 10 mM  $\text{MgCl}_2$  as proposed in the standard protocol (Figure 3a left), experiments were conducted using DNA origami diluted in 1 mM  $\text{MgCl}_2$  (Figure 3a center) as well as samples rebuffed into water (Figure 3a right). When decreasing the magnesium concentration to 1 mM, the origami structures start to break right at the point of manipulation. The height of the resulting accumulation of DNA material where the AFM tip scratching stopped is comparable to the samples containing higher  $\text{MgCl}_2$  buffer concentrations as indicated by the bright spots in the AFM images. For a  $\text{MgCl}_2$  concentration of 1 mM, however, adjacent parts of the origami

C

DOI: 10.1021/acs.langmuir.8b02362  
Langmuir XXXX, XXX, XXX–XXX



seem to be released from the substrate and stretched, as also observed in samples containing 10 mM  $\text{MgCl}_2$  (Figure 3a left). The part of the origami affected by AFM tip manipulation is usually removed over a stretch much wider (approximately 20 to 40 nm for Figure 3a left) than the AFM tip width (less than 10 nm), up to about one-third of a side length of the triangles. This behavior changes when conducting these experiments with DNA origami rebuffed in water (Figure 3a right, additional AFM data in Figure S12). Here, the manipulation leads to much sharper (more narrow) cuts, usually exhibiting a much smaller width that corresponds to the 10 nm diameter of the AFM tip. In contrast to magnesium-containing structures, no stretched DNA is visible.

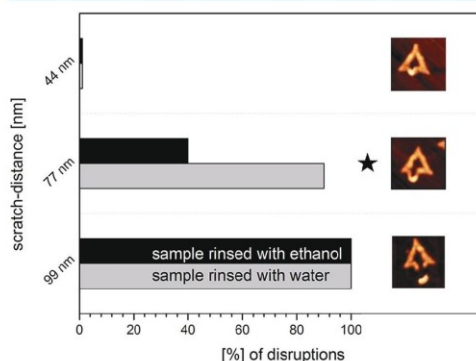
The ionic strength variation influences both the intramolecular stability of the DNA origami and the adsorption strength on the substrate. This is due to the divalent ion bridges between the negatively charged mica surface as well as the phosphate backbone of the DNA. Buffers containing lower ionic strength lead to origami with apparently decreased intramolecular stability, whereas the elasticity observed for higher ionic values is increased. When rebuffed into water, the AFM tip is able to cut through the DNA structures directly without stretching the structure. This change could also be based on the variation in substrate adhesion. However, DNA origami rebuffed in water seems even more stable on mica or is intramolecularly unstable as for higher magnesium concentrations, where loops are generated by the AFM tip movement and then finally appear to be pinned down to the surface again. Magnesium ions clearly affect the immobilization and surface attachment as well as the structural flexibility of DNA origami on mica. It was not possible to displace DNA origami with an AFM tip after drying by decreasing the magnesium ion concentration. This implies that magnesium facilitates the binding between mica and DNA (origami) in the liquid state. However, it was found that drying leads to attachment and immobilization, which is hardly locally overcome by the utilized manipulation technique. Rebuffering the origami in water did not result in the complete removal of magnesium ions located within the DNA origami structure. Certainly residues will remain and affect their behavior.

**Reverse Direction Manipulation: Inward.** To study the influence of the intramolecular stability as well as the scratch direction, a similar series of experiments were conducted for the opposite path direction of the tip, this time pointing inward into the triangular origami structure (Figure 3b). So instead of a stretching, an indentation was induced. The first experiment (Figure 3b left) with the standard magnesium ion concentration already differs in the results of opposite tip path directions: in all visibly manipulated triangles, material accumulation resulting in an increased height of approximately 4 nm is visible. As before, the affected side of the origami is extended toward the direction of manipulation. This time, DNA material can be found inside the triangle. Often the origami is disrupted during the process. Decreasing the magnesium ion concentration increases the ability to cut the DNA origami with the AFM tip (Figure 3b, center and right).

The performed experiments demonstrate that it is possible to manipulate DNA origami precisely in the nanometer range, which includes controlled cutting, folding, and stretching as a function of the magnesium concentration.

**Scratching Distance.** The experiments so far were conducted using a fixed distance of AFM tip movement. Next, this distance was varied in order to investigate the

percentage of structural breaks in the DNA origami. The same outward scratching directions as in Figure 3a were applied, as the results in this experimental setup were more homogeneous. Three experiments were conducted after water rinsing prior to drying: moving the AFM tip 44, 77, and 99 nm across the DNA origami structure (Figure 4) and subsequently counting



**Figure 4.** DNA origami disruptions induced by an AFM tip as a function of the scratch distance (44, 77, or 99 nm) and rinsing agent (water or ethanol). A minimum of 10 repetitions per distance and rinsing agent were performed. (See Table S15 for counted DNA origami ruptures and Table S16 for the statistical significance of the 77 nm scratch distance marked by a star, with a  $p$  value of 0.003216.) On this account, the graph maps the whole-numbered percentage of disruptions. The AFM images (insets) show typical results from the three utilized scratching distances.

the percentage of disrupted structures in relation to still completely closed ones. For a distance of 44 nm, nearly all origami structures remain structurally intact. This changes when the distance is increased to 77 nm, where about 90% of the origami structures are disrupted. A further significant increase to the 99 nm scratching distance results in all structures being ruptured. It is interesting that it is not possible to overstretch more than one of three sites under the given conditions, as the manipulation of two sites leads to an entirely destroyed DNA origami (Figure S13).

**Influence of Ethanol.** Ethanol is known to affect DNA's stability in solution. It is utilized in standard protocols for the precipitation of DNA, where it interferes with the electrostatic attraction between sodium and phosphate ions. These interactions are screened in water but increase when water is replaced partially by ethanol. Therefore, propanol was utilized in order to stabilize DNA for AFM imaging when immobilized on the surface.<sup>26,39</sup> Ethanol is supposed to fix and stabilize DNA on surfaces in general<sup>40,41</sup> and on mica by post-treatment<sup>42</sup> and not to destroy DNA origami,<sup>43</sup> although it induces the condensation of DNA.<sup>44</sup> Furthermore, ethanol does not dissolve salts, and in this case, it is expected to stabilize DNA by maintaining the magnesium concentration.<sup>29</sup> On the basis of this, immobilized DNA origami structures were rinsed with ethanol instead of water, and the same series of AFM tip scratching distances (44, 77, and 99 nm) was applied to these samples.

Short and very long manipulation distances of 44 and 99 nm, respectively, result in the same behavior for samples rinsed with water and those rinsed with ethanol: nearly all structures

D

DOI: 10.1021/acs.langmuir.8b02362  
Langmuir XXXX, XXX, XXX–XXX



are still intact after applying short manipulation distances, exhibiting only small indents, but get disrupted when applying long ones. However, the application of medium manipulation distances to water-rinsed samples results in more ruptures, with 90% of all manipulated structures ruptured, whereas only 40% of the ruptured origami structures are visible in ethanol-rinsed samples. Therefore, ethanol rinsing seems to considerably increase the stability and/or elasticity of DNA origami.

The manipulation is stable over time as demonstrated by the repeated imaging of manipulated samples after 1 day (Figure S14). Immobilized DNA origami are stable after rinsing and air-drying, as manipulation experiments after 4 weeks demonstrate (Figure S15).

As expected, the greater the scratch distance, the higher the probability of cutting DNA origami immobilized on mica. For a scratch distance of approximately 77 nm, those structures rinsed with ethanol show a higher flexibility than those rinsed with ddH<sub>2</sub>O, probably because of the fact that water dissolves magnesium in contrast to ethanol. That is the reason that ethanol fixes DNA origami on mica as well as magnesium in its internal structure. Hence, magnesium stabilizes DNA origami in solution and at the surface. These results are supported by published experiments that removed already-immobilized DNA origami from mica.<sup>45</sup>

The manipulation results depending on the magnesium concentration (Figure 3) indicate that either the internal stability of DNA origami is reduced and/or the surface attachment is weakened by lowering the magnesium concentration. This assumption is supported by the second set of experiments. However, the experiments do not allow a clear separation between the observed effects, which are surface attachment and internal stabilization.

## CONCLUSIONS

Precise manipulations of DNA origami in the nanometer range in air are presented, including cutting, folding, and stretching. It is possible to either cut or bulge out mica-immobilized triangular origami structures depending on the magnesium ion concentration of the immobilization step (prior to rinsing and drying). Therefore, the presence of these ions results in improved intramolecular strength and/or a greater elasticity of DNA origami.

Ruptures of the DNA origami are caused by increasing the stretch and scratch distance above a certain threshold. For the studied triangular origami structures with a 127 nm side length, a displacement of about 44 or 77 nm results in extended loops for magnesium-containing structures, which are immobilized at the surface and rinsed with ethanol. Only for a longer displacement of approximately 99 nm do all of the studied structures rupture. This behavior changes for water-rinsed structures. Here, a displacement of 77 nm already leads to rupture in a significant number (90%) of the studied samples. Finally, all structures are ruptured at 99 nm displacement.

This study introduces a special AFM-based nanomanipulation of immobilized DNA origami as a valuable tool for probing the highly localized intramolecular stability as well as the adsorption strength. The experiments confirm the influence of magnesium ions on DNA origami internal stabilization as well as surface attachment. In the future, it is planned to extend the investigations to functionalized structures as well as to the influence of other surfaces and ions in order to separate the contributions of the internal stability from the surface attachment strength. Eventually, the

difference could be clarified when surface treatment and immobilization are experimentally separated, using non-chemical surface charging approaches or working with ions which are less active in either DNA stabilization or surface immobilization. Furthermore, the localized bending as well as interrupting of DNA structures provides a valuable tool for studies on the mechanism of excitation transfer along DNA nanowires<sup>46–48</sup> by the ability to realize defined wire geometries.

## ASSOCIATED CONTENT

### Supporting Information

The Supporting Information is available free of charge on the ACS Publications website at DOI: 10.1021/acs.langmuir.8b02362.

AFM measurement and corresponding profiles, AFM-based nanomanipulation of DNA origami on mica, counted DNA origami disruptions induced by an AFM tip, and  $\chi^2$  test of DNA origami disruptions (DOCX)

## AUTHOR INFORMATION

### Corresponding Author

\*E-mail: wolfgang.fritzsche@leibniz-ipht.de.

### ORCID

Sophie Thamm: 0000-0001-7311-4170

### Notes

The authors declare no competing financial interest.

## ACKNOWLEDGMENTS

We gratefully acknowledge financial support from the following sources: BMBF (NanoSense, WITZ Armenia, FKZ 01DK17037) and DAAD (PPP France, FKZ 57316774). Furthermore, we thank Adrian Keller for providing the staple mix and the DNA Mitteldeutschland community for many fruitful discussions and useful hints. We want to thank Ann-Kristin Kaune and Wiebke Zillmer for assistance with measurements.

## REFERENCES

- (1) Binnig, G.; Rohrer, H.; Gerber, C.; Weibel, E. Surface studies by scanning tunneling microscopy. *Phys. Rev. Lett.* **1982**, *49*, 57.
- (2) Binnig, G.; Quate, C. F.; Gerber, C. Atomic Force Microscope. *Phys. Rev. Lett.* **1986**, *56*, 930–933.
- (3) Bhushan, B. *Nanotribology and Nanomechanics: An Introduction*; Springer: 2017.
- (4) Postma, H. W.; Sellmeijer, A.; Dekker, C. Manipulation and imaging of individual single-walled carbon nanotubes with an atomic force microscope. *Adv. Mater.* **2000**, *12*, 1299–1302.
- (5) Shiokawa, T.; Tsukagoshi, K.; Ishibashi, K.; Aoyagi, Y. *Nanostructure Construction in Single-Walled Carbon Nanotubes by AFM Manipulation*; Microprocesses and Nanotechnology Conference, 2001 International; IEEE; pp 164–165.
- (6) Baur, C.; Bugacov, A.; Koel, B. E.; Madhukar, A.; Montoya, N.; Ramachandran, T. R.; GRequicha, A. A.; Resch, R.; Will, P. Nanoparticle manipulation by mechanical pushing: underlying phenomena and real-time monitoring. *Nanotechnology* **1998**, *9*, 360–364.
- (7) Kim, S.; Shafiei, F.; Ratchford, D.; Li, X. Controlled AFM manipulation of small nanoparticles and assembly of hybrid nanostructures. *Nanotechnology* **2011**, *22*, 115301.
- (8) Yang, D.; Campolongo, M. J.; Tran, N.; Nguyen, T.; Ruiz, R. C.; Kahn, J. S.; Luo, D. Novel DNA materials and their applications. *WIREs: Nanomed. Nanobiotechnol.* **2010**, *2*, 648–669.

E

DOI: 10.1021/acs.langmuir.8b02362  
Langmuir XXXX, XXX, XXX–XXX

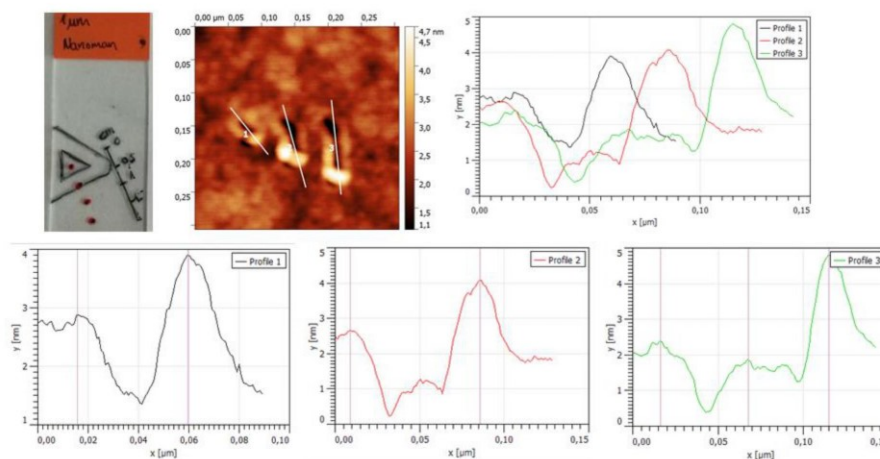
- (9) Pinheiro, A. V.; Han, D.; Shih, W. M.; Yan, H. Challenges and opportunities for structural DNA nanotechnology. *Nat. Nanotechnol.* **2011**, *6*, 763.
- (10) Anselmetti, D.; Fritz, J.; Smith, B.; Fernandes-Busquets, X. Single Molecule DNA Biophysics with Atomic Force Microscopy. *Single Mol.* **2000**, *1*, 53–58.
- (11) Hu, J.; Zhang, Y.; Li, B.; Gao, H.; Hartmann, U.; Li, M. Nanomanipulation of single DNA molecules and its applications. *Surf. Interface Anal.* **2004**, *36*, 124–126.
- (12) Lü, J. H. Nanomanipulation of extended single-DNA molecules on modified mica surfaces using the atomic force microscopy. *Colloids Surf., B* **2004**, *39*, 177–180.
- (13) Hards, A.; Zhou, C.; Seitz, M.; Bräuchle, C.; Zumbusch, A. Simultaneous AFM manipulation and fluorescence imaging of single DNA strands. *ChemPhysChem* **2005**, *6*, 534–540.
- (14) Fotiadis, D.; Scheuring, S.; Müller, S. A.; Engel, A.; Müller, D. J. Imaging and manipulation of biological structures with the AFM. *Micron* **2002**, *33*, 385–397.
- (15) Seeman, N. C. DNA engineering and its application to nanotechnology. *Trends Biotechnol.* **1999**, *17*, 437–43.
- (16) Rothmund, P. W. Folding DNA to create nanoscale shapes and patterns. *Nature* **2006**, *440*, 297–302.
- (17) Seeman, N. C. Structural DNA nanotechnology: growing along with Nano Letters. *Nano Lett.* **2010**, *10*, 1971–8.
- (18) Seeman, N. C. Nucleic acid junctions and lattices. *J. Theor. Biol.* **1982**, *99*, 237–247.
- (19) Zahid, M.; Kim, B.; Hussain, R.; Amin, R.; Park, S. H. DNA nanotechnology: a future perspective. *Nanoscale Res. Lett.* **2013**, *8*, 119.
- (20) Chao, J.; Lin, Y.; Liu, H.; Wang, L.; Fan, C. DNA-based plasmonic nanostructures. *Mater. Today* **2015**, *18*, 326–335.
- (21) Wang, P.; Meyer, T. A.; Pan, V.; Dutta, P. K.; Ke, Y. The beauty and utility of DNA origami. *Chem.* **2017**, *2*, 359–382.
- (22) Kuzyk, A.; Jungmann, R.; Acuna, G. P.; Liu, N. DNA Origami Route for Nanophotonics. *ACS Photonics* **2018**, *5*, 1151–1163.
- (23) Poppa, H.; Elliot, A. G. The surface composition of mica substrates. *Surf. Sci.* **1971**, *24*, 149–163.
- (24) Schürmann, R.; Bald, I. Real-time monitoring of plasmon induced dissociative electron transfer to the potential DNA radiosensitizer 8-bromoadenine. *Nanoscale* **2017**, *9*, 1951–1955.
- (25) Hansma, H. G.; Laney, D. E. DNA binding to mica correlates with cationic radius: assay by atomic force microscopy. *Biophys. J.* **1996**, *70*, 1933–1939.
- (26) Hansma, H. G.; Bezanilla, M.; Zenhausern, F.; Adrian, M.; Sinsheimer, R. L. Atomic force microscopy of DNA in aqueous solutions. *Nucleic Acids Res.* **1993**, *21*, 505–512.
- (27) Thundat, T.; Allison, D.; Warmack, R.; Brown, G.; Jacobson, K.; Schrick, J.; Ferrell, T. Atomic force microscopy of DNA on mica and chemically modified mica. *Scanning Microsc.* **1992**, *6*, 911–918.
- (28) Thomson, N.; Kasas, S.; Smith, B.; Hansma, H.; Hansma, P. Reversible binding of DNA to mica for AFM imaging. *Langmuir* **1996**, *12*, 5905–5908.
- (29) Anastassopoulou, J.; Theophanides, T. Magnesium–DNA interactions and the possible relation of magnesium to carcinogenesis. Irradiation and free radicals. *Critical reviews in oncology/hematology* **2002**, *42*, 79–91.
- (30) Dahlgren, P. R.; Lyubchenko, Y. L. Atomic force microscopy study of the effects of Mg<sup>2+</sup> and other divalent cations on the end-to-end DNA interactions. *Biochemistry* **2002**, *41*, 11372–11378.
- (31) Sobczak, J.-P. J.; Martin, T. G.; Gerling, T.; Dietz, H. Rapid Folding of DNA into Nanoscale Shapes at Constant Temperature. *Science* **2012**, *338*, 1458–1461.
- (32) Song, J.; Zhang, Z.; Zhang, S.; Liu, L.; Li, Q.; Xie, E.; Gothelf, K. V.; Besenbacher, F.; Dong, M. Isothermal Hybridization Kinetics of DNA Assembly of Two-Dimensional DNA Origami. *Small* **2013**, *9*, 2954–2959.
- (33) Engel, M. C.; Smith, D. M.; Jobst, M. A.; Sajfutdinow, M.; Liedl, T.; Romano, F.; Rovigatti, L.; Louis, A. A.; Doye, J. P. K. Force-Induced Unravelling of DNA Origami. *ACS Nano* **2018**, *12*, 6734–6747.
- (34) Woo, S.; Rothmund, P. W. K. Self-assembly of two-dimensional DNA origami lattices using cation-controlled surface diffusion. *Nat. Commun.* **2014**, *5*, 4889.
- (35) Aghebat Rafat, A.; Pirzer, T.; Scheible, M. B.; Kostina, A.; Simmel, F. C. Surface-Assisted Large-Scale Ordering of DNA Origami Tiles. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2014**, *53*, 7665–7668.
- (36) Kopiński, A.; Csaki, A.; Fritzsche, W. Surface Mobility and Ordered Rearrangement of Immobilized DNA Origami. *Langmuir* **2015**, *31*, 12106–12110.
- (37) Keller, A.; Bald, I.; Rotaru, A.; Cui, E.; Gothelf, K. V.; Besenbacher, F. Probing Electron-Induced Bond Cleavage at the Single-Molecule Level Using DNA Origami Templates. *ACS Nano* **2012**, *6*, 4392–4399.
- (38) Nečas, D.; Klapetek, P. Gwyddion: an open-source software for SPM data analysis. *Open Physics*, **2012**; Vol. *10*, p 181.
- (39) Hansma, H.; Vesenska, J.; Siegerist, C.; Kelderman, G.; Morrett, H.; Sinsheimer, R. L.; Elings, V.; Bustamante, C.; Hansma, P. Reproducible imaging and dissection of plasmid DNA under liquid with the atomic force microscope. *Science* **1992**, *256*, 1180–1184.
- (40) Gopinath, A.; Rothmund, P. W. K. Optimized Assembly and Covalent Coupling of Single-Molecule DNA Origami Nanoarrays. *ACS Nano* **2014**, *8*, 12030–12040.
- (41) Hung, A. M.; Micheel, C. M.; Bozano, L. D.; Osterbur, L. W.; Wallraff, G. M.; Cha, J. N. Large-area spatially ordered arrays of gold nanoparticles directed by lithographically confined DNA origami. *Nat. Nanotechnol.* **2010**, *5*, 121–6.
- (42) Nakayama, Y.; Tanaka, H.; Kawai, T. Stabilization of deoxyribonucleic acid network on mica surface using post ethanol treatment. *Jpn. J. Appl. Phys.* **2001**, *40*, L824.
- (43) Kim, H.; Surwade, S. P.; Powell, A.; O'Donnell, C.; Liu, H. Stability of DNA origami nanostructure under diverse chemical environments. *Chem. Mater.* **2014**, *26*, 5265–5273.
- (44) Wang, Y.; Ran, S.; Man, B.; Yang, G. Ethanol induces condensation of single DNA molecules. *Soft Matter* **2011**, *7*, 4425–4434.
- (45) Ramakrishnan, S.; Subramaniam, S.; Stewart, A. F.; Grundmeier, G.; Keller, A. Regular Nanoscale Protein Patterns via Directed Adsorption through Self-Assembled DNA Origami Masks. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2016**, *8*, 31239–31247.
- (46) Wirth, J.; Garwe, F.; Hahnel, G.; Csaki, A.; Jahr, N.; Stranik, O.; Paa, W.; Fritzsche, W. Plasmonic Nanofabrication by Long-Range Excitation Transfer via DNA Nanowire. *Nano Lett.* **2011**, *11*, 1505–1511.
- (47) Wirth, J.; Garwe, F.; Meyer, R.; Csaki, A.; Stranik, O.; Fritzsche, W. Plasmonically Enhanced Electron Escape from Gold Nanoparticles and Their Polarization-Dependent Excitation Transfer along DNA Nanowires. *Nano Lett.* **2014**, *14*, 3809–3816.
- (48) Toppari, J. J.; Wirth, J.; Garwe, F.; Stranik, O.; Csaki, A.; Bergmann, J.; Paa, W.; Fritzsche, W. Plasmonic Coupling and Long-Range Transfer of an Excitation along a DNA Nanowire. *ACS Nano* **2013**, *7*, 1291–1298.

F

DOI: 10.1021/acs.langmuir.8b02362  
Langmuir XXXX, XXX, XXX–XXX

# Supporting Information

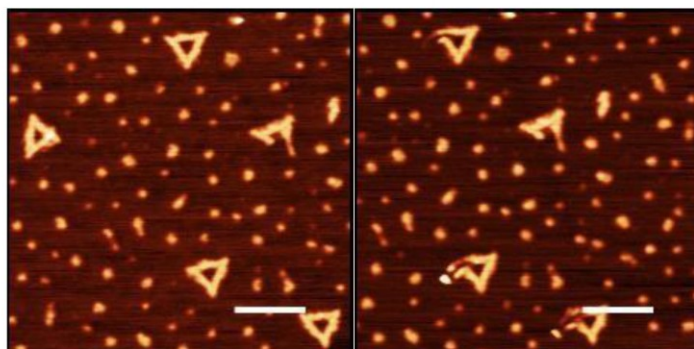
## Establishment of scratch-distance



**Figure S11.** In order to establish the length of the scratch-distances a soft PMMA surface was used for preliminary experiments using the same parameters as described in Experimental Section. Above: ruler, AFM measurement and corresponding profiles. Below: distance 1: 43.95 nm, distance 2: 76.91 nm, distance 3: 98.86 nm.

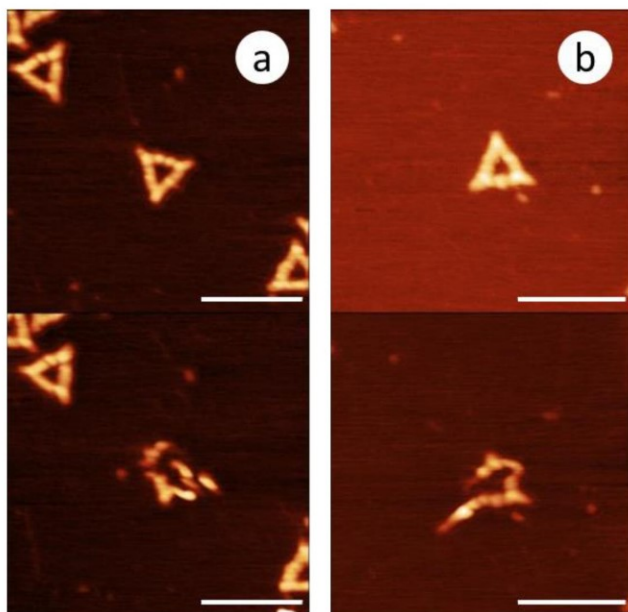


Additional reference to Figure 3



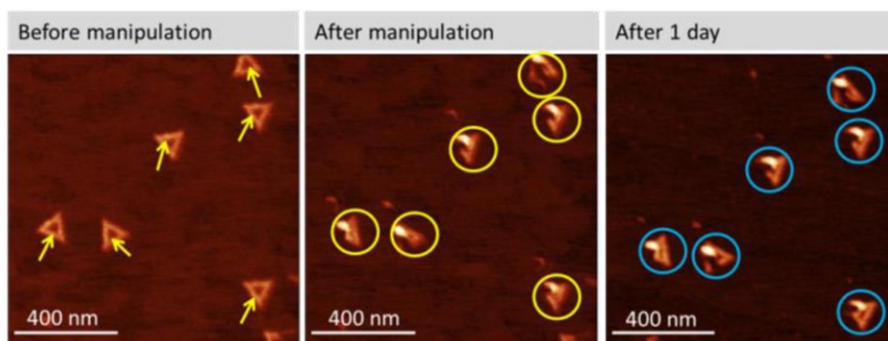
**Figure S12.** AFM-based nanomanipulation of DNA origami on mica with 0 mM  $\text{Mg}^{2+}$  concentration. (a) DNA origami before and (b) after the inside-to-outside manipulation, scale bar: 200 nm and height scale: 3 nm.

*Manipulation of two sites*



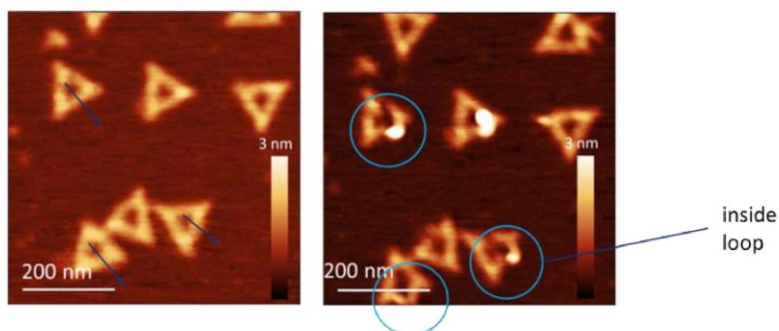
**Figure S13.** AFM-based nanomanipulation of two DNA origami (a,b) on mica with a  $\text{Mg}^{2+}$  concentration of 10 mM. Above: before and below: after manipulation, scale bar: 200 nm, height scale: 3 nm.

*Stability and retrievability of nanomanipulation*



**Figure S14.** AFM-based nanomanipulation of DNA origami on mica with a  $\text{Mg}^{2+}$  concentration of 1 mM, height scale: 3 nm. From left to right: DNA origami before manipulation/folding, immediately after manipulation and after 1 day. That indicates that the resulting manipulation/folding is stable and retrievable.

*Manipulation with an older sample*



**Figure S15.** AFM-based nanomanipulation of DNA Origami on mica with a  $\text{Mg}^{2+}$  concentration of 10 mM. Left: before and right: after manipulation. The experiment was performed 4 weeks after preparation. Consequently, older probes are manipulable and show a similar flexibility as freshly prepared samples.

*DNA origami disruptions*

**Table SI6.** Counted DNA origami disruptions induced by an AFM tip in dependence of scratch-distance and rinsing agent.

Scratch-distance	Water		Ethanol	
	Conducted repetitions	Disruptions	Conducted repetitions	Disruptions
44 nm	10	0	15	0
77 nm	22	19	11	4
99 nm	10	10	25	25

**Table SI7.** Chi square test of DNA origami disruptions for a scratch-distance of 77 nm.

	Disrupted	Non disrupted	Marginal Row Totals
Water	19 (15.33) [0.88]	3 (6.67) [2.02]	22
Ethanol	4 (7.67) [1.75]	7 (3.33) [4.03]	11
Marginal Column Totals	23	10	33 (Grand Total)

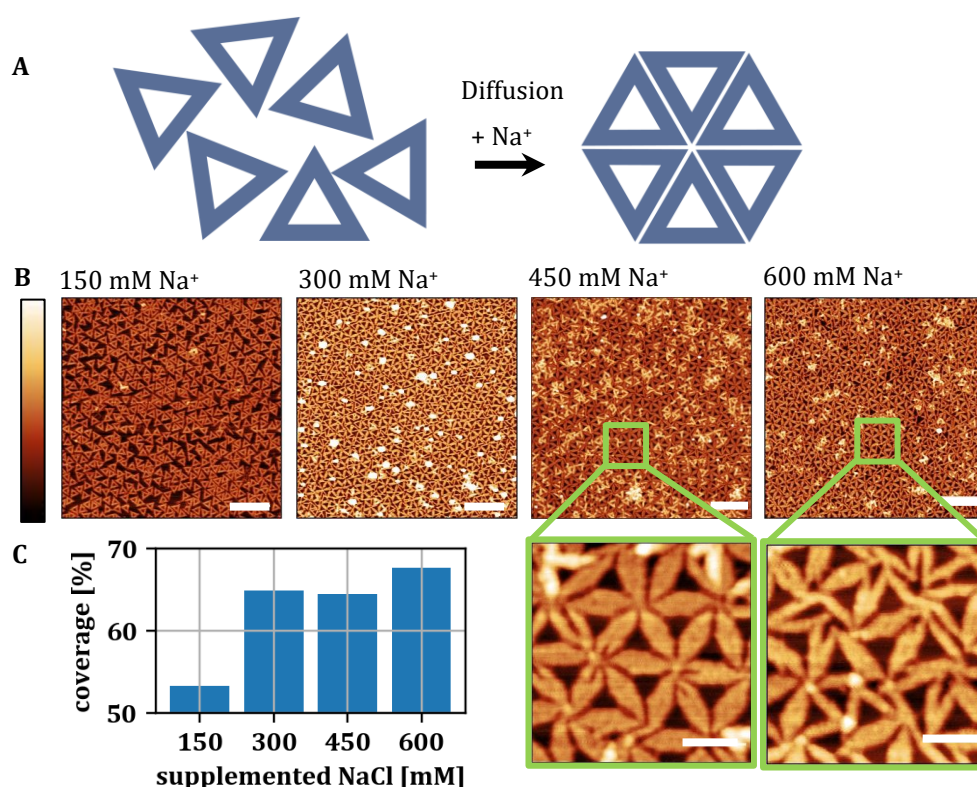
The chi-square statistic is 8.6804. The p-value is .003216. This result is significant at  $p < .05$ .

The test was performed for a scratch-distance of 77 nm. Here, 44 and 99 nm values count only as reference values.

### 3.2.3 Anordnung von DNA-Origami auf Glimmer

Geordnete DNA-Origami-Arrays können den Raum in verschiedene periodische Domänen unterteilen, in die eine Vielzahl von nanoskaligen Objekten integriert und schließlich als Nanosensor für die Nanoelektronik/Nanosensorik oder die Übertragung von Strukturen in der Nanolithographie verwendet werden können.<sup>51,67–70</sup> Ionenbasierte Wechselwirkungen können hierbei genutzt werden, um ein DNA-Origami-Array zu kreieren.<sup>62,64–66</sup>

Aufbauend auf den vorherigen Ergebnissen, wurden die DNA-Origami mithilfe von Natriumchloridzugabe remobilisiert und in einer möglichst dichten Packung auf Glimmer angeordnet. Die Wechselwirkung zwischen Glimmer, DNA und Magnesium kann durch Zugabe monovalente Kationen wie  $\text{Na}^+$  abgeschwächt werden, die DNA-Origami werden mobil und bilden geordnete Strukturen. Abbildung 14 zeigt das experimentale Schema und die DNA-Origami nach Natriumzugabe auf Glimmer angeordnet. Die DNA-Origami wurden hierfür aufkonzentriert (10 nM), mit 150–600 mM Natriumchlorid versetzt und 15 Minuten in humider Umgebung inkubiert.



**Abbildung 14 | Anordnung von DNA-Origami auf Glimmer durch Zugabe von Natriumchlorid** Schema der diffusionsbasierten Anordnung induziert durch  $\text{NaCl}$ -Zugabe (A), AFM-Aufnahmen der verschiedenen Natriumchloridkonzentrationen (150/300/450/600 mM), Maßstab: 500 nm, für Details: 100 nm und Höhenskala: 4 nm (B) und daraus resultierende Belegungsichte (C).

Durch die Zugabe von Natriumchlorid kommt es zu einer Konkurrenz von Magnesium und Natrium um die Bindestellen auf dem Substrat und die sofortige Immobilisierung findet nicht statt. Stattdessen induzieren Natriumionen eine Diffusion der DNA-Origami, sodass es zu einer dichten



Packung und damit Ausrichtung der Strukturen auf der Oberfläche kommt.<sup>65</sup> Dreieckige DNA-Origami richten sich dabei hexagonal aus. Die Belegungsdichte wurde als das Verhältnis von reiner DNA-Fläche zu Substratfläche bestimmt und kann durch die innere Aussparung der Dreiecksform nie 100 % betragen. Die Zugabe von 150 mM NaCl induziert eine Belegungsdichte von 54 %. Eine signifikante Erhöhung auf 65 % wird durch 300 mM erhalten, aber erst bei 450 mM bildet sich eine blumenähnliche Packung ohne Fehlstellen zwischen den einzelnen DNA-Origami aus, wobei noch viel überschüssiges Material über der ersten Lage liegt. Bei der Zugabe von 600 mM NaCl überdeckt weniger überschüssiges Material die erste Lage, jedoch werden in der Detailaufnahme Fehlstellen zwischen den DNA-Origami sichtbar.

## 3.2.4 M3 – DNA-Biofunktionalisierung von Goldnanowürfeln mit CTAC-Hülle



nanomaterials



Article

## DNA-Biofunctionalization of CTAC-Capped Gold Nanocubes

Nicole Slesiona <sup>†</sup>, Sophie Thamm , H. Lisa K. S. Stolle, Viktor Weißenborn, Philipp Müller, Andrea Csáki and Wolfgang Fritzsche <sup>\*</sup>

Leibniz-Institute for Photonic Technology, Albert-Einstein-Straße 9, 07745 Jena, Germany; SlesionaN@cardiff.ac.uk (N.S.); sophie.thamm@leibniz-ipht.de (S.T.); lisa.stolle@leibniz-ipht.de (H.L.K.S.S.); viktor.weissenbornviktor@leibniz-ipht.de (V.W.); philipp.mueller@leibniz-ipht.de (P.M.); andrea.csaki@leibniz-ipht.de (A.C.)

<sup>\*</sup> Correspondence: wolfgang.fritzsche@leibniz-ipht.de

<sup>†</sup> Current address: School of Biosciences, Cardiff University, Museum Avenue, Cardiff CF10 3AX, UK.

Received: 11 May 2020; Accepted: 3 June 2020; Published: 5 June 2020



**Abstract:** Clinical diagnostics and disease control are fields that strongly depend on technologies for rapid, sensitive, and selective detection of biological or chemical analytes. Nanoparticles have become an integral part in various biomedical detection devices and nanotherapeutics. An increasing focus is laid on gold nanoparticles as they express less cytotoxicity, high stability, and hold unique optical properties with the ability of signal transduction of biological recognition events with enhanced analytical performance. Strong electromagnetic field enhancements can be found in close proximity to the nanoparticle that can be exploited to enhance signals for e.g., metal-enhanced fluorescence or Raman spectroscopy. Even stronger field enhancements can be achieved with sharp-edged nanoparticles, which are synthesized with the help of facet blocking agents, such as cetyltrimethylammonium bromide/chloride (CTAB/CTAC). However, chemical modification of the nanoparticle surface is necessary to reduce the particle's cytotoxicity, stabilize it against aggregation, and to bioconjugate it with biomolecules to increase its biocompatibility and/or specificity for analytical applications. Here, a reliable two-step protocol following a ligand exchange with bis (p-sulfonatophenyl) phenyl phosphine (BSPP) as the intermediate capping-agent is demonstrated, which results in the reliable biofunctionalization of CTAC-capped gold nanocubes with thiol-modified DNA. The functionalized nanocubes have been characterized regarding their electric potential, plasmonic properties, and stability against high concentrations of NaCl and MgCl<sub>2</sub>.

**Keywords:** biofunctionalization; CTAC; shape-anisotropic nanoparticles; gold nanocubes; DNA

## 1. Introduction

Noble metal nanoparticles exhibit special physical and optical properties. This effect originates in the specific interaction of the metal nanoparticles upon irradiation with light. Namely, collective oscillations of the conduction band electrons are induced that are known as ‘particle plasmons’ or localized surface plasmons (LSP) [1,2]. Due to their strong interaction with light in the visible spectrum and the strong field enhancements that can be found at edges and corners of such nanostructures [3], shape-anisotropic gold nanoparticles have become an integral part in various biomedical detection devices and nanotherapeutics. The design of novel biosensors with the ability of signal transduction of biological and chemical recognition events into characteristic optical signals utilizing metal nanoparticles is of growing interest [4]. The high biocompatibility of gold nanoparticles especially facilitates their incorporation into biosensor designs that exhibit enhanced analytical performance [5].

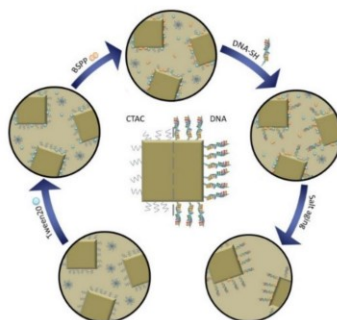
To integrate shape-anisotropic gold nanoparticles into analytic sensing devices it is necessary to establish a reliable functionalization protocol.

Shape-anisotropic geometry of chemically synthesized particles is usually realized by application of customized surface ligands [6–9]. These capping agents play a versatile role and are used to control size and shape, stabilize against aggregation, as well as to ensure the structural stability of the nanoparticles [10,11]. The aggregation tendency of nanoparticles based on van der Waals forces is counteracted by surface capping agents that prevent the particles from aggregation, typically based on electrostatic and/or steric stabilization [12]. However, these ligands often restrict the access of reactants to the particle surface, impeding the further functionalization of the particle, which neutralizes their otherwise useful properties. In many cases, these capping agents hamper further conjugation reactions. Removing these surfactants often results in colloidal instability and coalescence [13]. Furthermore, surface ligands render colloidal particle solutions more complex by changing the overall ionic composition of the medium. Thus, the choice of ligand influences the surface charge of the particle and the interactions between the capping molecules and possible reactants [10,14]. While gold nanoparticles themselves and the influence of their shape and size have been studied well, their outer organic shells and their effect on particle functionalization remain elusive and are the subject of extensive research. The functionalization of the particles with biomolecules is based on either surfactant replacement or conjugation of additional groups while maintaining colloidal stability [13–19]. Hence, mild ligand exchange reactions are needed in order to enable the biofunctionalization of gold nanoparticles.

Often times, functional biomolecules such as DNA cannot sufficiently penetrate a dense layer of capping agents or replace them. There are several protocols that have been developed for gold nanoparticle functionalization with thiol-modified DNA. Widely adapted techniques are the salt-aging method by Mirkin et al. [20] and surfactant-assisted methods that are often applied in protocols aimed at the biofunctionalization of shape-anisotropic gold nanoparticles as proposed by Li et al. [21]. Furthermore, there are viable protocols like low-pH-assisted methods as published by Zhang et al. [22], or the freezing-driven method by Liu et al. [23], and lastly a method by Lekkerker et al. who realized gold nanoparticle functionalization by depletion stabilization [24]. Surfactant-assisted methods aim at replacing surface ligands by adding an excess of small molecules with higher affinity towards the metallic nanoparticle. These small molecules make room for new and bigger ligands that contain—or are modified with—groups with even higher affinity to gold than the previous ligand [21,25]. This approach of particle functionalization was accomplished with several different nanoparticle shapes, such as nanorods, -spheres, -prisms, and -cubes (synthesized with cetyltrimethylammonium bromide (CTAB)) [20–22,26,27]. Aside from surfactants, a few small molecules or polymers have also been applied to facilitate DNA conjugation while avoiding gold nanoparticle aggregation. For example, Alivisatos et al. displaced citrate by using dipotassium bis(p-sulfonatophenyl) phenylphosphine dihydrate (BSPP) as an intermediate and stabilized ligand [28,29].

Gold nanocubes can be easily synthesized with high precision regarding their dimensions with the help of a microfluidic synthesis set up resulting in gold nanocubes with low size distribution and an immensely reduced material consumption [30]. Their synthesis is realized with the help of cetyltrimethylammonium chloride (CTAC), which is also frequently used in batch synthesis approaches [30,31]. There is a variety of protocols suggesting different paths to exchange surface ligands like citrate and CTAB with functional, biocompatible groups [11,13,32–34], including the removal of CTAC ligands from the gold nanosphere's, nanostar's, or nanocube's surface [35–37]. Current methods are either based on a solvent extraction by dichloromethane (DCM) or use an ethanol-methanol mixture or the irritant acetonitrile to remove CTAC. However, the above mentioned approaches are hardly compatible with biological applications. This problem could be resolved by CTAC removal using the salt-aging method combined with sodium dodecyl sulfate (SDS) stabilization [38]. However, this approach employs reagents that are known to express limited biocompatibility or even toxicity like CTAB and benzyldimethylhexadecylammonium chloride (BDAC). To overcome this limitation, we utilized a mild ligand-exchange to achieve a straightforward biofunctionalization

of CTAC-capped gold cubes with DNA, in order to allow their utilization of these particles for bioanalytical applications. Although this applies less to purely sensing purposes, other application like the envisioned—and already partially realized (see e.g., [39])—use of particles for in vivo therapy depend on minimal cytotoxicity. The developed two-step protocol presented in this work combines the approaches of ligand-exchange with salt-aging (Figure 1). This allows for a reliable, non-invasive, and efficient conjugation of thiol-modified DNA oligonucleotides to shape-anisotropic particles with great potential for biosensing applications and nanotherapeutics.



**Figure 1.** Schematic illustration of the functionalization process. Cetyltrimethylammonium chloride (CTAC) (blue squiggles) coated gold nanocubes are stabilized with Tween20 (blue spheres) to perform a ligand exchange reaction. The CTAC is thus replaced with bis (p-sulfonatophenyl) phenyl phosphine (BSPP) (orange double spheres), which both stabilizes the particles and allows the biofunctionalization with DNA as a weak ligand. A denser DNA-loading onto the particle is subsequently achieved by a salt-aging step. Here, the thiol groups gradually displace the DNA bases that are adsorbed and therefore wrapped around the gold nanoparticles and therefore hindering the access of additional DNA-stands to the particle surface. The salt-aging step neutralizes the negative DNA backbone and hydrolyzes the DNA bases that would otherwise adsorb to the nanoparticle surface.

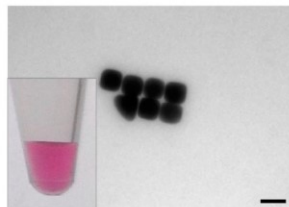
## 2. Materials and Methods

All chemicals were purchased from Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Taufkirchen, Germany) unless otherwise noted and were used without further purification.

### 2.1. Synthesis of Gold Nanocubes

The synthesis of gold nanocubes was carried out based on the method reported by Wu et al. [31,40]. In the first step, gold seeds were obtained by combining 0.025 M  $\text{HAuCl}_4$  and 0.1 M CTAC solution in a total volume of 10 mL. Subsequently, 450  $\mu\text{L}$  of freshly prepared ice cold  $\text{NaBH}_4$  solution (0.02 M) was added under vortexing. A color change of the solution from colorless to lucent brown indicates successful seed formation. During the 1 h incubation time of the seeds at room temperature (21  $^{\circ}\text{C}$ ), two batches of growth solution (GS1 and GS2), each consisting of 9.625 mL 0.1 M CTAC solution, 250  $\mu\text{L}$  of 0.01 M  $\text{HAuCl}_4$  solution, and 10  $\mu\text{L}$  0.01 M NaBr solution, 90  $\mu\text{L}$  of 0.04 M ascorbic acid solution, were prepared. After incubation, 60  $\mu\text{L}$  of the seed solution was added to the first growth solution GS1 at 30  $^{\circ}\text{C}$  under shaking. After 5 s, after which a visible color change of the solution from clear to light red occurred, 60  $\mu\text{L}$  of the now light red GS1 was added to the second growth solution GS2 at 30  $^{\circ}\text{C}$  under shaking for 10 s. Without further treatment, GS2 was then left for 8 min to allow reaction/particle growth during which the color of the solution turned from colorless to red/pink. Subsequently, the solution was centrifuged at 3000 rpm for 5 min. After the centrifugation step, the supernatant was removed and the nanocubes were redispersed in 10 mL ddH<sub>2</sub>O. Figure 2 shows a TEM image of the synthesized gold nanocubes.





**Figure 2.** TEM image of gold nanocubes, which show a bright pink color in colloidal solution (inset: photograph of nanocube solution). The gold nanocubes had a size of  $49.4 \pm 5$  nm with a surface area of  $0.0146 \mu\text{m}^2$ , scalebar: 50 nm.

## 2.2. Conjugation of Gold Nanocubes

First, the particles were washed with DEPC water 1–2 times and adjusted to an OD at the localized surface plasmon resonance (LSPR) maximum ( $\lambda_{\text{centroid}}$ ) of 5. The subsequent biofunctionalization was conducted by successive addition of 5  $\mu\text{L}$  2% aqueous Tween<sup>®</sup> 20, 5  $\mu\text{L}$  0.1 M BSPP, 15  $\mu\text{L}$  0.6 mM thiol-modified capping strands for overnight incubation (5'-(ATT)<sub>3</sub>T<sub>4</sub>-(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>-SH 3' by Biomers GmbH, Ulm, Germany), 3 M NaCl in six steps of  $5 \times 20 \mu\text{L}$  and  $1 \times 25 \mu\text{L}$  to 30  $\mu\text{L}$  gold nanocubes. Between the additions of each reactant, the sample was vortexed and incubated in a Thermomixer comfort (Eppendorf AG, Hamburg, Germany) at 400 rpm and RT for 20 min, followed by a final incubation for 48 h on an orbital shaker at 400 rpm and RT. Finally, the sample was purified by centrifugation at  $5000 \times g$  for 10 min, removing the supernatant and addition of 0.02% aqueous SDS for additional stabilization. The washing step was conducted three times.

## 2.3. Zeta ( $\zeta$ ) Potential Measurements

$\zeta$  potential measurements were performed with a Zetasizer ZEN3600 Malvern Instruments Ltd. (Worcestershire, UK) and were conducted in disposable folded capillary cells (DTS1070). In the Zetasizer software, the parameters were set as follows: (1) material: gold (Malvern), (2) dispersant: water at a temperature of 25 °C (viscosity 0.8872 cP, refractive index: 1.330), (3) equilibration time for temperature stabilization: 120 s, (4) measurement: 3 measurements with no delay in between with at least 10 runs per measurement. The mean of the measurements was calculated and plotted.

## 2.4. UV–VIS Spectroscopy

Gold nanocubes were spectrally characterized with a ThermoScientific<sup>™</sup> NanoDrop One (Waltham, MA, USA) and a V-670 Jasco UV–VIS/NIR spectrophotometer (Easton, MD, USA). The spectra were measured in 0.5 nm (NanoDrop) and 0.1 nm (Jasco) wavelength increments. The obtained raw data was evaluated using a custom-made Python 3.7 script. The center of gravity of the localized surface plasmon resonance (LSPR) peak ( $\lambda_{\text{centroid}}$ ) was calculated according to Dahlin et al. [41]. Peaks that were compared for validation of particle functionalization with thiol-modified DNA were normalized to improve the visual distinction between  $\lambda_{\text{centroid}}$  of unmodified and modified gold nanocubes. The UV–VIS range of 200–300 nm is thereby not considered in the discussion of all obtained UV–VIS spectra because of the strong signals of Tween<sup>®</sup> 20 and BSPP at 231 nm and 270 nm, respectively. Due to their high intensity, they superimpose DNA peaks at 260 nm. Additionally, UV–VIS spectroscopy was used as a characterization method for colorimetric salt-induced aggregation assays.

# 3. Results and Discussion

## 3.1. Conjugation of Gold Nanocubes

To realize the binding of thiol-modified DNA oligonucleotides to gold nanocubes deriving from detergent-based synthesis, experiments testing various published functionalization methods aimed at

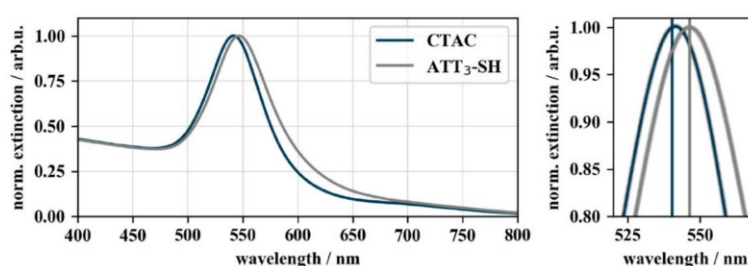
particle biofunctionalization were conducted. The protocols were applied in their original form as published as well as with additional adjustments that are known to increase DNA-loading onto gold nanoparticles. Experiments solely based on either low-pH-assisted, salt-assisted or surfactant-assisted ligand-exchange methods did not lead to successful gold nanocube biofunctionalization (details given in Appendix A).

In ligand-exchange protocols, small surfactants are used to detach previous surfactants and make room for bulkier new ligands. When trying out different protocols, particle aggregation was observed at different stages of nanoparticle functionalization. The most promising attempts, in which particle aggregation occurred only in the late steps of the functionalization protocols, were combined to a single protocol that resulted in the successful biofunctionalization of gold nanocubes (Table 1). In conclusion, 20 min incubation time was introduced after each reactant addition step in order to prevent particle aggregation. Indeed, the particles remained stable during the whole process, and salt addition did not result in particle destabilization. The final protocol combined the salt-assisted with the surfactant-assisted method.

**Table 1.** Protocols and adjustments in gold nanocube functionalization. The table lists the approaches to conjugate gold nanocubes, marking the point at which irreversible particle aggregation occurred. ✓ marks no aggregation at the given point, × marks irreversible aggregation. The salt concentrations express the end concentration of NaCl in the sample after all steps of addition (ligand exchange by Liu et al. in 2015).

Protocol	Comments, Additional Adjustments		Stability of Gold Nanocubes			LSPR ( $\lambda_{\text{centroid}}$ ) Shift
			In Reaction Mixture	During Incubation	After Purification	
Ligand exchange			Salt concentration and temperature			
	0.5 M NaCl	25 °C	✓	×	-	-
		55 °C	✓	×	-	-
	0.25 M NaCl	25 °C	✓	×	-	-
		55 °C	✓	×	-	-
	0 M NaCl	25 °C	✓	✓	✓	×
Final protocol			✓	✓	✓	✓

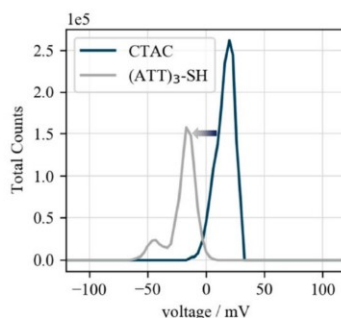
To confirm the successful conjugation by a shift of the LSPR peak, UV-VIS spectra of the functionalized particles were recorded. The results are displayed in Figure 3. Gold nanocubes showed a wavelength shift of 5.3 nm after bioconjugation of CTAC-capped gold nanocubes from 541.3 nm to 546.5 nm. This red-shift can be explained as a consequence of the increased local refractive index caused by the adsorption of DNA on the particle surface [42]. DNA exhibits a refractive index of 1.45 (for ssDNA at a length of 27 nt) [43] while water and CTAB (comparable to CTAC) have a refractive index of 1.33 and 1.41 [44], respectively.



**Figure 3.** UV-VIS spectra of CTAC- and DNA-functionalized gold nanocubes. The UV-VIS spectra show the 5.3 nm wavelength shift of the localized surface plasmon resonance (LSPR) peak from 541.2 nm of CTAC-capped (blue) to 546.5 nm of DNA-capped (grey) gold nanocubes. The spectra were normalized to their peak maximum to allow a better comparison of the LSPR shift ( $OD_{\text{final}} = 0.26$ ).

### 3.2. Characterization of the DNA-Conjugation Process Using $\zeta$ Potential Measurements

The successful particle functionalization was further confirmed by  $\zeta$  potential measurements. As the CTA+ ligands are positively charged, nanoparticles capped with these ligands possess a positive  $\zeta$  potential, whereas following DNA-functionalization, a negative  $\zeta$  potential is expected due to the negative DNA backbone. Thus, a  $\zeta$  potential shift from positive (+20 mV) to negative (−17 mV) confirms the success of biofunctionalization (Figure 4).

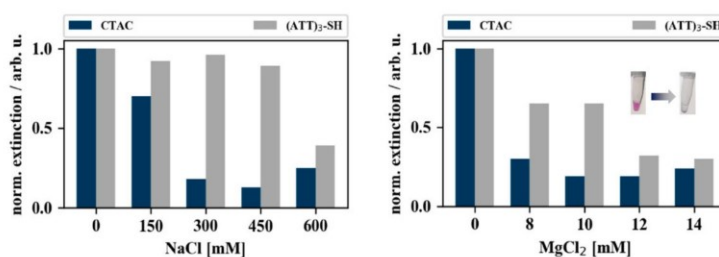


**Figure 4.**  $\zeta$  potential of biofunctionalized gold nanocubes.  $\zeta$  potentials of CTAC- (+20 mV) and (ATT)<sub>3</sub>-SH-capped (−17 mV) gold nanocubes. The shift from positive to negative confirms the replacement of the positively charged CTA+ ligands by the negatively charged DNA-strands.

### 3.3. Validation of DNA-Conjugation Using Colorimetric Aggregation Tests

Nanoparticles capped with their synthesis ligand cannot withstand higher salt concentrations and will aggregate [32]. The aggregation of gold nanoparticles causes the loss of their plasmonic properties and hence their characteristic color in colloidal solution. Therefore, the change in the optical density of the nanoparticle solution following salt addition can be used as a basis for a colorimetric proof of stability. This change in the extinction behavior can be measured by UV-VIS spectroscopy [45].

Figure 5 illustrates the results of the aggregation experiments conducted with gold nanocubes, by monitoring the loss in extinction (color) of the colloidal particle solutions. CTAC-capped gold nanocubes (blue bars) aggregated right upon addition of salt. The DNA-capped gold nanoparticles (grey bars) expressed higher salt stability compared to their CTAC-capped counter parts but aggregated nevertheless when subjected to MgCl<sub>2</sub> concentrations above 10 mM (additional spectra are given in Appendix B Figure A1).



**Figure 5.** Coalescence of gold nanocubes when subjected to different concentrations of NaCl and MgCl<sub>2</sub>. The bar charts depict the normalized extinction intensities of CTAC-capped (blue) and (ATT)<sub>3</sub>-capped (grey) gold nanocubes after 30 min incubation with varying concentrations of MgCl<sub>2</sub> (right) and NaCl (left). The extinction intensities were normalized to the extinction intensity of the samples that were not incubated with salt (0 mM). Typical color change upon salt addition is shown as inset.



#### 4. Conclusions and Outlook

The paper introduces a protocol to conjugate CTAC-capped gold nanocubes with thiol-modified DNA-oligonucleotides for bioanalytical and nanotherapeutic applications. The presented method combines a mild ligand-exchange reaction with a salt-aging method under biocompatible conditions. The characterization of the functionalized particles by LSPR-shift measurement, Zeta potential measurements and colorimetric aggregation assays gives further insight into bioconjugation and stability of nanoparticles capped with CTAC.

The colorimetric aggregation assay with the utilized 13-mer DNA-oligonucleotides indicated that the conjugated particles were able to withstand up to 10 mM  $MgCl_2$  before particle aggregation was observed. In the future, an increased salt stability can be achieved by functionalizing the particles with longer DNA-oligonucleotide capping strands. The increased salt stability of gold nanocubes was realized by the additional electrostatic stabilization due to the additional charging of the DNA backbone and the additional steric shielding from the external environment. The presented results show a reproducible alternative conjugation technique for shape-anisotropic plasmonic nanoparticles. The two-step ligand-exchange reaction under mild biocompatible conditions allows the use of such conjugates for bioanalytical applications with high biocompatibility with a yield of 25%. Although the ionic stability of the particles is not yet sufficient for direct cellular applications, knowledge of this concentration threshold is paramount when using these conjugates as nanocomponents for biomedical detection devices and nanotherapeutics. Here, the buffer composition is of great importance and must meet various requirements, e.g., for the assembly of DNA superstructures. Especially DNA origami-based nanosensors hold great potential for smart biosensing applications in the future [46,47].

**Author Contributions:** Conceptualization, S.T., N.S., A.C., and W.F.; methodology, N.S., H.L.K.S.S., and V.W.; software, P.M.; validation, N.S. and S.T.; formal analysis, N.S.; writing—original draft preparation, N.S. and S.T.; writing—review and editing, H.L.K.S.S., A.C., and W.F.; visualization, N.S. and S.T.; supervision, A.C. and W.F. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** This research was funded by BMBF NanoSense, grant number 01DK17037 and RA-detect, grant number 01DQ16003.

**Acknowledgments:** We gratefully thank Danja Kuhfuß for particle synthesis assistance and Franka Jahn for transmission electron microscopic (TEM) characterization of the cubes. We acknowledge the Leibniz Institute of Age Research—Fritz Lipmann Institute (FLI) Jena providing access to TEM and Katrin Buder (FLI) for help with TEM the publication of this article was funded by the Open Access Fund of the Leibniz Association.

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest. The funders had no role in the design of the study; in the collection, analyses, or interpretation of data; in the writing of the manuscript, or in the decision to publish the results.

#### Appendix A

Several attempts to functionalize gold nanocubes were made. Different functionalization protocols that were originally designed for functionalization of gold nanorods and -spheres were tested for their applicability to gold nanocubes. The protocols were tried out several times with slight adjustments of either pH, salt concentration, or incubation conditions.

The first approach that was tested was the pH-assisted method by Zhang et al. that is usually applied in gold nanosphere biofunctionalization. Minor adjustments were made, as functionalization protocols of anisotropic nanoparticles generally suggest higher concentrations of capping strands to achieve biofunctionalization. Hence, 13  $\mu$ L of 0.6 M capping strands, 200  $\mu$ L of CTAC-capped Gold nanocubes, and 87  $\mu$ L DEPC-treated H<sub>2</sub>O were added together in a 0.5 mL reaction tube and incubated for 30 min on a Thermomixer at RT and 300 rpm. Following incubation, 6  $\mu$ L of 0.5 M citrate buffer (pH 3, adjusted with 37% HCl) were added. After another incubation cycle of 30 min on a Thermomixer at RT and 300 rpm, 41.7  $\mu$ L 5 M NaCl were added (end concentration of 0.6 M NaCl) and the solution was incubated for 60 min in a Thermomixer at RT and 300 rpm. In a second try, half of the above-mentioned salt concentration was used.

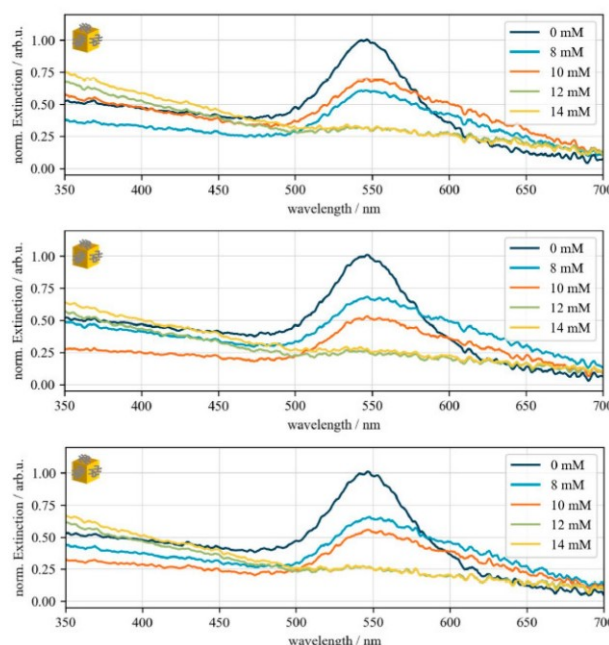


Salts like NaCl are used in gold nanoparticle DNA-functionalization protocols to overcome the electrostatic repulsion of the DNA backbone and to increase the density of the final DNA-layer around the particle. Yet, gold nanocubes capped with CTAC express a positive charge. When NaCl is added to the gold nanocubes, the Debye length between the particles shortens due to charge compensation of the added Cl<sup>-</sup> ions. If the interparticle repulsion decreases to a certain point, strong van der Waals forces between the gold nanoparticles cause their aggregation, rendering the particles unusable for further experiments. This ambivalent characteristic makes salt addition both necessary but also undesirable. This problem has been solved by Mirkin et al. who proposed a so-called salt-aging method. Here, salts are added gradually over a time period of 24 h to provide the means of slowly functionalizing the gold nanoparticles with DNA by decreasing the electrostatic repulsion between the capping strands, while not causing colloidal instability by rapidly increasing the salt concentration.

Following the salt-assisted method, 7.5 µL gold nanocubes were mixed with 7.5 µL of 0.6 M thiol-modified capping strands and 85 µL of DEPC-treated H<sub>2</sub>O. After 30 min incubation at RT, 4 µL of 0.5 M citrate buffer were added followed by another incubation step of 45 min at RT. Subsequently, 2 µL 1 M NaCl were added to the sample. After 3 h of incubation at RT, 2.5 µL 5 M NaCl were pipetted into the reaction mixture. After a 3 h incubation step, 3.8 µL 5 M NaCl were added. Finally, the sample was centrifuged at 4000× g for 10 min to remove the supernatant and resuspended the particles in DEPC-treated H<sub>2</sub>O. Additional adjustments that were made to this protocol are stated in.

A method that was proposed by Liu et al. in 2015 approaches biofunctionalization of shape-anisotropic gold nanoparticles by first exchanging the gold nanoparticles capping of CTAB partially with a smaller molecule to achieve better accessibility to the particle surface (surfactant-assisted method). For example, surfactants like Tween<sup>®</sup> 20 and SDS initially adsorb on the particle surface, stabilizing them against low salt concentrations. The proposed protocol was slightly adjusted for Gold nanocubes functionalization. Then, 5 µL of the nonionic surfactant Tween<sup>®</sup> 20 (2%, aqueous solution) was used to stabilize 30 µL gold nanocubes solution. Subsequently, 5 µL 0.1 M BSPP were added. BSPP is a small molecule that can penetrate the dense CTAB layer of gold nanorods and additionally stabilize the particles with its two negative charges. The same behavior was expected towards the CTAC layer of gold nanocubes. A total of 15 µL of 0.6 M thiol-modified DNA were added to the sample followed by addition of NaCl to an end concentration of 0.5 M. Following a 24 h incubation at RT and 900 rpm on a Thermomixer, the sample was centrifuged for 10 min and 6000 g, and the supernatant replaced by 0.02% aqueous SDS solution. The washing step was repeated twice. Any additional adjustments that were made to this protocol are listed in the table included in the manuscript.

## Appendix B



**Figure A1.** Validation of  $\text{MgCl}_2$ -induced gold nanocube destabilization. UV-Vis spectra of different salt stability experiments of biofunctionalized gold nanocube to validate the aggregation threshold between 10 and 12 mM  $\text{MgCl}_2$ . Dark blue: 0 mM  $\text{MgCl}_2$ , light blue: 8 mM  $\text{MgCl}_2$ , orange: 10 mM  $\text{MgCl}_2$ , green: 12 mM  $\text{MgCl}_2$ , yellow: 14 mM  $\text{MgCl}_2$ . For better comparison, the spectra were normalized to centroid of the sample that was not incubated with salt (0 mM).

## References

1. Mie, G. Beiträge zur Optik trüber Medien speziell kolloidaler Metallösungen. *Ann. Phys.* **1908**, *25*, 377–445. [\[CrossRef\]](#)
2. Kelly, K.L.; Coronado, E.; Zhao, L.L.; Schatz, G.C. The Optical Properties of Metal Nanoparticles: The Influence of Size, Shape, and Dielectric Environment. *J. Phys. Chem. B* **2003**, *107*, 668–677. [\[CrossRef\]](#)
3. Agrawal, A.; Kriegel, I.; Milliron, D.J. Shape-Dependent Field Enhancement and Plasmon Resonance of Oxide Nanocrystals. *J. Phys. Chem. C* **2015**, *119*, 6227–6238. [\[CrossRef\]](#)
4. Li, Y.; Schluesener, H.J.; Xu, S. Gold nanoparticle-based biosensors. *Gold Bull.* **2010**, *43*, 29–41. [\[CrossRef\]](#)
5. Li, M.; Cushing, S.K.; Wu, N. Plasmon-enhanced optical sensors: A review. *Analyst* **2015**, *140*, 386–406. [\[CrossRef\]](#)
6. Xia, Y.N.; Xiong, Y.J.; Lim, B.; Skrabalak, S.E. Shape-Controlled Synthesis of Metal Nanocrystals: Simple Chemistry Meets Complex Physics? *Angew. Chem. Int. Edit.* **2009**, *48*, 60–103. [\[CrossRef\]](#)
7. Love, J.C.; Estroff, L.A.; Kriebel, J.K.; Nuzzo, R.G.; Whitesides, G.M. Self-assembled monolayers of thiolates on metals as a form of nanotechnology. *Chem. Rev.* **2005**, *105*, 1103–1170. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
8. Sajanalal, P.R.; Sreepasad, T.S.; Samal, A.K.; Pradeep, T. Anisotropic nanomaterials: Structure, growth, assembly, and functions. *Nano Rev.* **2011**, *2*. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
9. Wang, H.; Zhang, Q.; Villarreal, E.; Jing, H.; Chen, K. In Situ Monitoring of Catalytic Molecular Transformations on Noble Metal Nanocatalysts Using Surface-Enhanced Raman Spectroscopy. *J. S. C. Acad. Sci.* **2020**, *18*. [\[CrossRef\]](#)

10. Niu, Z.; Li, Y. Removal and Utilization of Capping Agents in Nanocatalysis. *Chem. Mater.* **2014**, *26*, 72–83. [\[CrossRef\]](#)
11. Heuer-Jungemann, A.; Feliu, N.; Bakaimi, I.; Hamaly, M.; Alkilany, A.; Chakraborty, I.; Masood, A.; Casula, M.F.; Kostopoulou, A.; Oh, E.; et al. The Role of Ligands in the Chemical Synthesis and Applications of Inorganic Nanoparticles. *Chem. Rev.* **2019**, *119*, 4819–4880. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
12. Bishop, K.J.M.; Wilmer, C.E.; Soh, S.; Grzybowski, B.A. Nanoscale Forces and Their Uses in Self-Assembly. *Small* **2009**, *5*, 1600–1630. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
13. Liu, B.; Liu, J. Methods for preparing DNA-functionalized gold nanoparticles, a key reagent of bioanalytical chemistry. *Anal. Methods* **2017**, *9*, 2633–2643. [\[CrossRef\]](#)
14. McMahon, J.M.; Emory, S.R. Phase Transfer of Large Gold Nanoparticles to Organic Solvents with Increased Stability. *Langmuir* **2007**, *23*, 1414–1418. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
15. Joshi, P.P.; Yoon, S.J.; Hardin, W.G.; Emelianov, S.; Sokolov, K.V. Conjugation of Antibodies to Gold Nanorods through Fc Portion: Synthesis and Molecular Specific Imaging. *Bioconjug. Chem.* **2013**, *24*, 878–888. [\[CrossRef\]](#)
16. Li, X.; Qian, J.; He, S. Impact of the self-assembly of multilayer polyelectrolyte functionalized gold nanorods and its application to biosensing. *Nanotechnology* **2008**, *19*, 355501. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
17. Indrasekara, A.S.D.S.; Wadams, R.C.; Fabris, L. Ligand Exchange on Gold Nanorods: Going Back to the Future. *Part. Part. Syst. Charact.* **2014**, *31*, 819–838. [\[CrossRef\]](#)
18. Vigderman, L.; Manna, P.; Zubarev, E.R. Quantitative Replacement of Cetyl Trimethylammonium Bromide by Cationic Thiol Ligands on the Surface of Gold Nanorods and Their Extremely Large Uptake by Cancer Cells. *Angew. Chem.* **2012**, *124*, 660–665. [\[CrossRef\]](#)
19. Gentili, D.; Ori, G.; Comes Franchini, M. Double phase transfer of gold nanorods for surface functionalization and entrapment into PEG-based nanocarriers. *Chem. Commun.* **2009**, 5874–5876. [\[CrossRef\]](#)
20. Hurst, S.J.; Lytton-Jean, A.K.R.; Mirkin, C.A. Maximizing DNA Loading on a Range of Gold Nanoparticle Sizes. *Anal. Chem.* **2006**, *78*, 8313–8318. [\[CrossRef\]](#)
21. Li, J.; Zhu, B.; Zhu, Z.; Zhang, Y.; Yao, X.; Tu, S.; Liu, R.; Jia, S.; Yang, C.J. Simple and rapid functionalization of gold nanorods with oligonucleotides using an mPEG-SH/Tween 20-assisted approach. *Langmuir* **2015**, *31*, 7869–7876. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
22. Zhang, X.; Servos, M.R.; Liu, J. Instantaneous and Quantitative Functionalization of Gold Nanoparticles with Thiolated DNA Using a pH-Assisted and Surfactant-Free Route. *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 7266–7269. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
23. Liu, B.; Liu, J. Freezing-driven DNA adsorption on gold nanoparticles: Tolerating extremely low salt concentration but requiring high DNA concentration. *Langmuir* **2019**, *35*, 6476–6482. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
24. Lekkerkerker, H.N.W.; Tuinier, R. Depletion Interaction. In *Colloids and the Depletion Interaction*; Lecture Notes in Physics; Springer: Dordrecht, The Netherlands, 2011; pp. 57–108. ISBN 978-94-007-1223-2.
25. Ansar, S.M.; Ameer, F.S.; Hu, W.; Zou, S.; Pittman Jr, C.U.; Zhang, D. Removal of molecular adsorbates on gold nanoparticles using sodium borohydride in water. *Nano Lett.* **2013**, *13*, 1226–1229. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
26. O'Brien, M.N.; Jones, M.R.; Brown, K.A.; Mirkin, C.A. Universal noble metal nanoparticle seeds realized through iterative reductive growth and oxidative dissolution reactions. *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, *136*, 7603–7606. [\[CrossRef\]](#)
27. Szustakiewicz, P.; González-Rubio, G.; Scarabelli, L.; Lewandowski, W. Robust Synthesis of Gold Nanotriangles and their Self-Assembly into Vertical Arrays. *ChemistryOpen* **2019**, *8*, 705–711. [\[CrossRef\]](#)
28. Alivisatos, A.P.; Johnsson, K.P.; Peng, X.; Wilson, T.E.; Loweth, C.J.; Bruchez, M.P., Jr.; Schultz, P.G. Organization of “nanocrystal molecules” using DNA. *Nature* **1996**, *382*, 609–611. [\[CrossRef\]](#)
29. Loweth, C.J.; Caldwell, W.B.; Peng, X.; Alivisatos, A.P.; Schultz, P.G. DNA-based assembly of gold nanocrystals. *Angew. Chem. Int. Ed.* **1999**, *38*, 1808–1812. [\[CrossRef\]](#)
30. Thiele, M.; Knauer, A.; Malsch, D.; Csáki, A.; Henkel, T.; Köhler, J.M.; Fritzsche, W. Combination of microfluidic high-throughput production and parameter screening for efficient shaping of gold nanocubes using Dean-flow mixing. *Lab Chip* **2017**, *17*, 1487–1495. [\[CrossRef\]](#)
31. Wu, H.-L.; Kuo, C.-H.; Huang, M.H. Seed-Mediated Synthesis of Gold Nanocrystals with Systematic Shape Evolution from Cubic to Trisectahedral and Rhombic Dodecahedral Structures. *Langmuir* **2010**, *26*, 12307–12313. [\[CrossRef\]](#)
32. Liu, B.; Liu, J. Freezing directed construction of bio/nano interfaces: Reagentless conjugation, denser spherical nucleic acids, and better nanoflares. *J. Am. Chem. Soc.* **2017**, *139*, 9471–9474. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)

33. Chang, L.; Khan, Y.; Li, L.; Yang, N.; Yin, P.; Guo, L. Colorimetric detection of HVA by self-assembly of Au nanorods with DNA double helices to give side-by-side and end-to-end structures. *RSC Adv.* **2017**, *7*, 13896–13903. [\[CrossRef\]](#)
34. Naz, G.; Anjum, M.N.; Irfan, M.; Irfan, M.; Arshad, M.; Bajwa, S.Z.; Khan, W.S. Quats stabilized gold nanospheres for efficient ligand exchange procedure. *Results Mater.* **2020**, *5*, 100065.
35. Dewi, M.R.; Laufersky, G.; Nann, T. A highly efficient ligand exchange reaction on gold nanoparticles: Preserving their size, shape and colloidal stability. *RSC Adv.* **2014**, *4*, 34217–34220. [\[CrossRef\]](#)
36. Lee, D.; Yoon, S. Gold Nanocube–Nanosphere Dimers: Preparation, Plasmon Coupling, and Surface-Enhanced Raman Scattering. *J. Phys. Chem. C* **2015**, *119*, 7873–7882. [\[CrossRef\]](#)
37. Martín-Sánchez, C.; Sánchez-Iglesias, A.; Mulvaney, P.; Liz-Marzán, L.M.; Rodríguez, F. Plasmonic Sensing of Refractive Index and Density in Methanol–Ethanol Mixtures at High Pressure. *J. Phys. Chem. C* **2020**, *124*, 8978–8983. [\[CrossRef\]](#)
38. Kim, M.; Ko, S.M.; Lee, C.; Son, J.; Kim, J.; Kim, J.-M.; Nam, J.-M. Hierarchic Interfacial Nanocube Assembly for Sensitive, Selective, and Quantitative DNA Detection with Surface-Enhanced Raman Scattering. *Anal. Chem.* **2019**, *91*, 10467–10476. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
39. Masse, F.; Ouellette, M.; Lamoureux, G.; Boisselier, E. Gold nanoparticles in ophthalmology. *Med. Res. Rev.* **2019**, *39*, 302–327. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
40. Thiele, M.; Soh, J.Z.E.; Knauer, A.; Malsch, D.; Stranik, O.; Müller, R.; Csáki, A.; Henkel, T.; Köhler, J.M.; Fritzsche, W. Gold nanocubes—Direct comparison of synthesis approaches reveals the need for a microfluidic synthesis setup for a high reproducibility. *Chem. Eng. J.* **2016**, *288*, 432–440. [\[CrossRef\]](#)
41. Dahlin, A.B.; Tegenfeldt, J.O.; Höök, F. Improving the Instrumental Resolution of Sensors Based on Localized Surface Plasmon Resonance. *Anal. Chem.* **2006**, *78*, 4416–4423. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
42. Schneider, T.; Jahr, N.; Jatschka, J.; Csaki, A.; Stranik, O.; Fritzsche, W. Localized surface plasmon resonance (LSPR) study of DNA hybridization at single nanoparticle transducers. *J. Nanopart. Res.* **2013**, *15*, 1–10. [\[CrossRef\]](#)
43. Elhadj, S.; Singh, G.; Saraf, R.F. Optical Properties of an Immobilized DNA Monolayer from 255 to 700 nm. *Langmuir* **2004**, *20*, 5539–5543. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
44. Yu, C.; Varghese, L.; Irudayaraj, J. Surface Modification of Cetyltrimethylammonium Bromide-Capped Gold Nanorods to Make Molecular Probes. *Langmuir* **2007**, *23*, 9114–9119. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
45. Englebienne, P. Use of colloidal gold surface plasmon resonance peak shift to infer affinity constants from the interactions between protein antigens and antibodies specific for single or multiple epitopes. *Analyst* **1998**, *123*, 1599–1603. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
46. Prinz, J.; Schreiber, B.; Olejko, L.; Oertel, J.; Rackwitz, J.; Keller, A.; Bald, I. DNA Origami Substrates for Highly Sensitive Surface-Enhanced Raman Scattering. *J. Phys. Chem. Lett.* **2013**, *4*, 4140–4145. [\[CrossRef\]](#)
47. Heck, C.; Kanehira, Y.; Kneipp, J.; Bald, I. Placement of Single Proteins within the SERS Hot Spots of Self-Assembled Silver Nanolenses. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2018**, *57*, 7444–7447. [\[CrossRef\]](#)

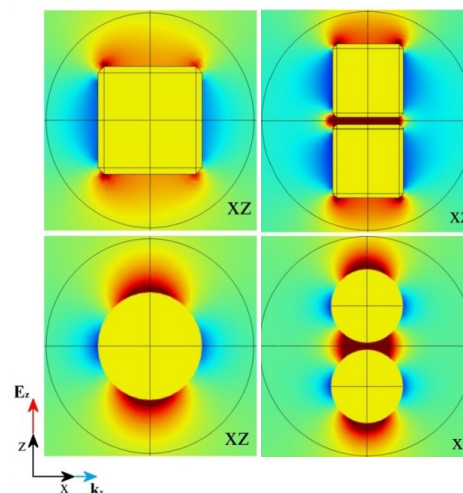


© 2020 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).



### 3.2.5 Anbindung von Goldnanowürfeln an DNA-Origami

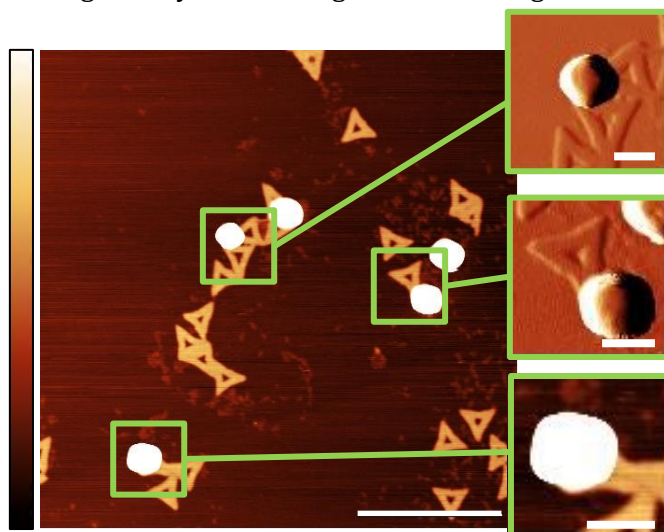
Die Organisation von Nanopartikeln mit den von DNA-Origami bereitgestellten Auflösungen erlaubt es, das plasmonische Verhalten von DNA-Origami-Nanopartikel-Konstruktionen zu steuern. Die Simulation (Abbildung 15) zeigt die Feldverstärkung hervorgerufen durch sphärische Goldnanopartikel und Goldnanowürfel als Einzelpartikel bzw. als Dimer.<sup>104</sup> Das elektrische Feld wird an den Ecken und Kanten von metallischen Nanopartikeln stark verstärkt, da die Plasmonen an diesen Stellen lokalisiert sind, weil diese Geometrie die höchste Amplitude der Elektronenwolken-schwingung erlaubt.<sup>29,31</sup> Ein SERS-Bioassay basierend auf einer hierarchischen Nanowürfelanordnung zur kontrollierten Verstärkung des elektromagnetischen Feldes zwischen



**Abbildung 15 | Simulation der Feldverstärkungen bei Goldnanopartikeln** Feldverstärkung hervorgerufen durch einen (links) und zwei koppelnde (rechts) sphärische Goldnanopartikel/Goldnanowürfel.<sup>129</sup>

Goldnanowürfeln wurde etabliert.<sup>105</sup> Besonders die Konstruktion eines Goldnanowürfel-Dimers mit DNA-Origami für den Einzelmolekülnachweis im entstandenen „hot spot“ ist vielversprechend, da hier der Verstärkungseffekt besonders groß ist

Dafür wurden die funktionalisierten Goldnanowürfel mit DNA-Origami im Verhältnis 1:1 hybridisiert (Abbildung 16). Es wurden mehrere große Zusammenschlüsse aggregierter Nanopartikel gefunden, was die geringe Oberflächenbedeckung in anderen Bereichen der Probe erklärt. Dies scheint auf die Tatsache zurückzuführen zu sein, dass der Grenzwert für die Salzstabilität gegenüber  $MgCl_2$  zwischen 10 und 12 mM liegt. Höchstwahrscheinlich konnten nicht alle biofunktionalisierten Nanopartikel der  $MgCl_2$ -Konzentration des DNA-Origami-Puffers standhalten. Jedoch hat eine Reihe von Goldnanowürfeln, die nicht aggregiert sind, mit den DNA-Origami hybridisiert. Dabei liegt die Hybridisierungseffizienz bezogen auf einzelne Goldnanowürfel bei 50 % ( $N = 80$ ).



**Abbildung 16 | Konjugation von funktionalisierten Goldnanowürfeln an DNA-Origami** Es wurden vergrößerte Ausschnitte als Beispiel gewählt, um verschiedene Ergebnisse des Konjugationsprozesses zu zeigen: (oben, Amplitudenbild) ein Partikel, der zwei DNA-Origami verbindet, (mittig, Amplitudenbild) ein teilweise konjugierter Goldnanowürfel und (unten) ein Goldnanowürfel, der ein DNA-Origami fast vollständig bedeckt, Maßstab: 500 nm, für Details: 100 nm, Höenskala: 4 nm.

### 3.2.6 M4 – MiRNA-Biosensor basierend auf lokalisierter Oberflächenplasmonenresonanz verstärkt durch oberflächengebundene Hybridisierungskettenreaktion

Manuscript

[Click here to view linked References](#)

#### **A miRNA biosensor based on localized surface plasmon resonance enhanced by surface-bound hybridization chain reaction.**

**Andrea Miti<sup>a</sup>, Sophie Thamm<sup>c</sup>, Philipp Müller<sup>c</sup>, Andrea Csáki<sup>c</sup>, Wolfgang Fritzsche<sup>c\*</sup>, Giampaolo Zuccheri<sup>a,b\*</sup>**

<sup>a</sup> Department of Pharmacy and Biotechnology and Interdepartmental Center for Industrial Research for Life and Health Sciences, University of Bologna, via San Giacomo 11, Bologna, Italy

<sup>b</sup> S3 Center, Institute of Nanoscience of the Italian CNR, Italy

<sup>c</sup> Leibniz Institute of Photonic Technology, Albert-Einstein-Str. 9, 07745 Jena, Germany

\*To whom correspondence should be addressed: [giampaolo.zuccheri@unibo.it](mailto:giampaolo.zuccheri@unibo.it)

#### **Highlights**

- Over- or underexpression of microRNAs can serve as biomarkers for diseases, such as cancer.
- A miRNA biosensor based on localized plasmon resonance and enzyme-free amplification is here reported.
- The biosensor can quantitate specific microRNA in 1 hour and can be multiplexed.
- The sensitivity and specificity of the biosensor is within a diagnostically-useful range.

## Abstract

The dysregulation of the concentration of individual circulating microRNAs or small sets of them has been recognized as a marker of disease. For example, an increase of the concentration of circulating miR-17 has been linked to lung cancer and metastatic breast cancer, while its decrease has been found in multiple sclerosis and gastric cancer. Consequently, techniques for the fast, specific and simple quantitation of microRNAs are becoming crucial enablers of early diagnosis and therapeutic follow-up. DNA based biosensors can serve this purpose, overcoming some of the drawbacks of conventional lab-based techniques. Herein, we report a cost-effective, simple and robust biosensor based on localized surface plasmon resonance. Immobilized gold nanoparticles are used for the detection of miR-17. Specificity of the detection was achieved by the use of hairpin surface-tethered probes and the hybridization chain reaction was used to amplify the detection signal and thus extend the dynamic range of the quantitation. Less than 1 hour is needed for the entire procedure that achieved a limit of detection of about 1 pM or 50 attomoles/measurement, well within the reported useful range for diagnostic applications. We suggest that this technology could be a promising substitute of traditional lab-based techniques for the detection and quantification of miRNAs after these are extracted from diagnostic specimens and their analysis is thus made possible.

**Keywords:** Localized Surface Plasmon Resonance, DNA, microRNA, Hybridization Chain Reaction, Self-assembly

## 1. Introduction

There is an ongoing trend for faster and better performing methods for nucleic acids detection and quantification. Especially when fighting diseases, it is important to have faster and cheaper diagnosis in order to reduce the response time, the stress on patients and the cost of the overall monitoring of large patient cohorts. This is for example the case for cancer screening (World Cancer Report 2020) or for population testing in rapidly evolving epidemics, as it has recently happened for COVID-19 (Lamb et al. 2020). Very reliable and quick assays are required, in order to detect several markers aiming to return more robust results. MicroRNAs (miRNA) are involved in many cellular processes, such as metabolism, cell growth, and proliferation. MiRNAs are expressed in tissue-specific manners and they are released in bodily fluids such as saliva, urine, and blood, where they are referred to as circulating miRNA (Chandra et al. 2017; Cortez et al. 2011; Hwang and Mendell 2006; Turchinovich et al. 2011; Vidigal and Ventura 2015). The concentration of specific sets of MiRNA in cells and bodily fluids is altered in pathological conditions, making them a useful class of diagnostic biomarkers for a large number of diseases, if not potentially for all physiological and pathological states (Aushev et al. 2013; Bianchi et al. 2012; Calin and Croce 2006; Qin et al. 2015; Sethi et al. 2014).

In bodily fluids, miRNAs are not present as simple, soluble and readily detectable RNA, rather they are commonly shuttled around inside stable extracellular lipid-based vesicles. In diagnostics and research, the RNA needs to be extracted from the patient's specimen first, by disassembling such vesicles, before any further analysis. After established molecular biology methods (or commercial kits) are used to obtain the short RNAs from the specimen, miRNAs are commonly detected and quantified with a choice of lab-based techniques, including qPCR, next generation sequencing or microarrays. Some drawbacks in such lab-based techniques make the detection and quantification of miRNA difficult. Their short length, the high sequence homology between miRNAs with different biological roles and their low concentration in biological specimens represent analytical challenges. Alternative methods and techniques are required in order to make it easier and more reliable to detect and quantitate miRNAs and so advance their uptake as diagnostic biomarkers for disease (Graybill and Bailey 2016; Tavallaie et al. 2015).

DNA-based biosensors can in principle overcome the complexity and cost of lab-based techniques (Abi et al. 2018; Chao et al. 2016). Of interest for miRNA detection, signal amplification strategies have been devised in order to extend the dynamic range of use of this class of biosensors and facilitate their uptake in diagnostics. Isothermal amplification methods involving DNA have been shown to overcome more complex PCR-based techniques in obtaining quantitative information about the presence of specific nucleic acids (Deng et al. 2017). The hybridization chain reaction (HCR) is an enzyme-free isothermal amplification strategy based on the triggered self-assembly of two DNA hairpins in solution in the presence of a specific target sequence (Dirks and Pierce 2004). This reaction was proven to be largely adaptable to DNA-based sensing, leading to the enhancement of the sensitivity thanks to the formation of higher molecular weight structures. Promising applications of HCR in biosensing have been reported with various signal detection techniques (Augspurger et al. 2018; Bi et al. 2017). HCR can be exploited in order to accumulate an amount of DNA on a sensing surface: this can then be easily detected, for



example, through Surface Plasmon Resonance (SPR) or other label-free techniques. We showed that surface-bound HCR polymerization can be measured with SPR towards the detection of pathogen DNA (Spiga et al. 2014). Localized Surface Plasmon Resonance (LSPR) (Willems and Van Duyne 2007), a phenomenon involving the interaction between light and metallic nanostructures, allows the realization of simple and small biosensors (Cappi et al. 2013; Cappi et al. 2015; Schneider et al. 2013). In LSPR, the energy coupling is observable as a drop in the transmitted light, which yields a peak in the UV-vis absorbance spectrum of the nanoparticles (Jung et al. 1998). A high sensitivity can be achieved by using a simple light source and a spectrophotometer (Chen et al. 2008). LSPR has been proficiently harnessed towards biosensing (Csaki et al. 2018). DNA-based LSPR sensors have been used to detect microbial DNA or RNA and other DNA biomarkers after PCR amplification (Fong and Yung 2013; Liu et al. 2013; Parab et al. 2010; Soares et al. 2014). Implementations of LSPR for the analysis of miRNA have been previously reported (Joshi et al. 2014; Ki et al. 2019). Ki and coworkers demonstrated that coupling LSPR and HCR provides a gain in sensitivity in the detection (Ki et al. 2019). We herein propose a simple biosensor based on HCR and LSPR for the specific detection of miRNAs, and we test it towards the detection of miR-17 sequence. Mir-17 was chosen as a target since it is dysregulated in the blood of patients affected by different kinds of cancer and thus it is a promising biomarker for diagnosis and follow-up (Bianchi et al. 2011; Boeri et al. 2011; Dyson et al. 2018; Eichelser et al. 2013; Hesari et al. 2019; Kral et al. 2018; Zeng et al. 2014; Zhang et al. 2019). For example, circulating Mir-17 is increased in patients with lung cancer (Momi et al. 2014) and with metastatic breast cancer (Eichelser et al. 2013) or decreased in patients with gastric cancer (Zeng et al. 2014).

## 2. Material and Methods

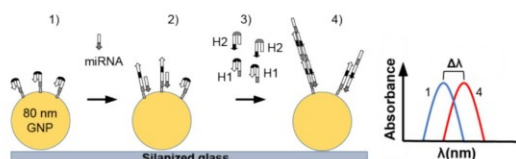
The LSPR setup employed in this work has been described before (Thamm et al. 2018). Briefly, the optical LSPR setup was composed of a halogen light source (HL-2000 by Ocean Optics Inc., Dunedin, USA) with a bandpass filter <400 nm, a spectrometer (Flame s UV-VIS by Ocean Optics GmbH, Ostfildern, Germany), and two custom made optical large-core fibers. The microfluidic system involved a computer-controlled peristaltic pump (Ismatec Reglo ICC by Cole-Parmer GmbH, Wertheim, Germany), and a custom-made fluidic cell with tubings (Tygon LMT-55, 0.13 mm inner diameter by Techlab GmbH, Braunschweig, Germany).

The LSPR chips were obtained by immobilizing 80 nm gold nanoparticles on APTES-treated glass slides (see SI for further experimental details) (Thamm et al. 2018) and they could be stored for up to several days in a dry and clean atmosphere. Immediately before functionalization, the stored chips with the immobilized gold nanoparticles were rinsed with EtOH and ultrapure water, and subsequently subjected to a 1 min UV/Ozone treatment (UV ozone cleaner UVC-1014 NanoBioAnalytics, Berlin, Germany). The thiolated oligonucleotide probe (previously reduced with 20 mM TCEP (for 1 h in ultrapure water) was adjusted to 2  $\mu$ M in 0.5 M citrate buffer, pH 6.0, and was deposited on the chip in a controlled-humidity chamber. The probe was then incubated for 18 h at room temperature. After the incubation, the chips were rinsed with citrate buffer and ultrapure water, prior to storage in the running buffer before use (0.75 M NaCl, 75 mM sodium phosphate,

pH 6.8). The oligonucleotide-derivatized chips were used within one day of preparation.

Probe-functionalized chips were mounted on the LSPR microfluidic cell and the different target, wash and DNA hairpin solutions were alternatively pumped over the chip surface (as described in the results section) thanks to computer-controlled valve switches. LSPR spectra were recorded every 2 s, the centroid of the LSPR peak was calculated in real-time and displayed (Dahlin et al. 2006). Further details are given in the extended Methods section in the SI.

### 3. Results and Discussion



Scheme 1. Scheme of the working principle of the proposed method based on LSPR sensing and Hybridization Chain Reaction (HCR). 1) The probe H1 is immobilized on the gold nanoparticles (GNP) 2) The specific miRNA target is added and it interacts with the specific probe. 3) The mixture of hairpins is added and 4) Hybridization chain reaction takes place on the gold nanoparticles. Each step is monitored using LSPR in real time.

We obtained the enhancement of a previously developed LSPR nucleic acid biosensor (Thamm et al. 2018; Zopf et al. 2019) by integrating surface HCR on it. This biosensor was reproduced by immobilizing 80 nm spherical gold nanoparticles on glass slides. Gold nanoparticles are chosen for their stability and ease of derivatization. Spherical 80 nm gold nanoparticles are a good compromise as they are stable, commercially available or easy to make in a lab and have a good plasmonic response (Yockell-Lelièvre et al. 2015). Nanoparticles of alternative shapes or larger sizes could make more sensitive LSPR biosensors but they would be more difficult to source, and more variable in shape, stability and plasmonic properties. The LSPR chips were prepared by adsorbing gold nanoparticles in crowded sub-monolayers. The amount of gold dispersion to use depends on its available concentration and it was optimized under AFM control (see Fig. S9B) so that the large majority of the inter-particle distances was larger than the particle diameter and the plasmonic peak was narrow and reproducible (see SI text for more detail and Fig. S9).

For surface derivatization, the immobilized nanoparticles were exposed to thiolated oligonucleotide probes. Differently from the previously presented versions of this type of biosensor, the nucleic-acid probe for miRNA recognition here was a DNA hairpin oligonucleotide with a 6-nt loop and a 6-nt overhang (see Fig. S1) instead of a linear DNA oligonucleotide. This was chosen in order to maximize the sequence specificity of the interaction (thanks to the energy penalty of the hairpin opening) and to trigger the subsequent recognition-dependent HCR reaction only in the case of complete sequence-specific hairpin unfolding, not simply upon binding of any sequence (see Scheme 1). The hairpin probe was designed in the context of the guidelines for HCR (Miti and Zuccheri 2018), and it was merely a thiolated version of one of the two HCR

hairpin components. The probe-derivatized chip were passivated with mercaptohexanol and treated with salmon sperm DNA. The steps involved in the detection of this enhanced LSPR biosensor are sketched in Scheme 1.

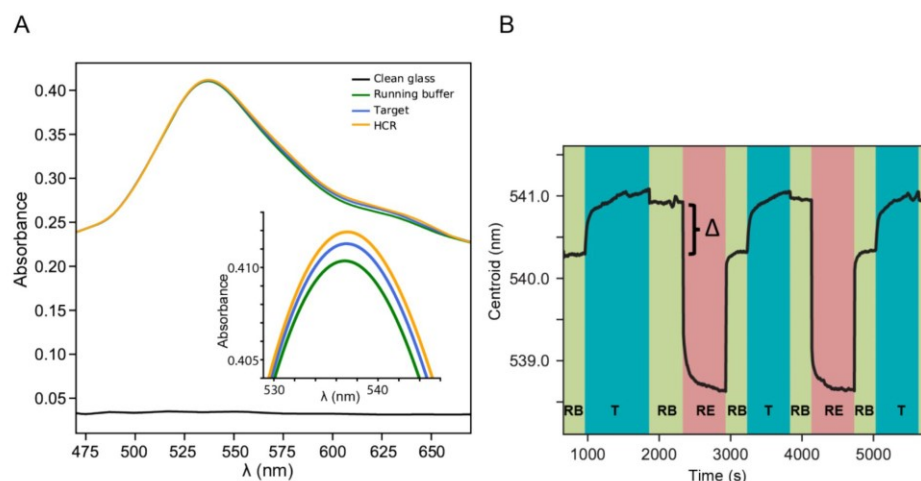


Figure 1.A) Example spectra for the biosensors before (running buffer) and after exposure to target MiR17 oligonucleotide or full HCR. In the inset, the enlarged detail of the peaks showing the plasmonic shift (the running buffer peak is here centered at 540.6 nm, the target peak at 541.0 nm, the HCR at 541.5 nm). The spectra have been smoothed through polynomial fitting. B) Typical plot of the centroid position over time obtained during the measurement for miR-17 detection in running buffer. On the y-axis is the LSPR centroid wavelength ( $\lambda_{\text{LSPR}}$ ). The shifts ( $\Delta$  in the figure) were calculated by taking the difference between the  $\lambda_{\text{LSPR}}$  peak position of the plasmonic sensor after and before the injection of miR-17. The concentration of miR-17 here was 1  $\mu\text{M}$  (RB, running buffer; T, target MiR17 oligonucleotide; RE, regeneration solution).

After the glass slides with adsorbed probe-derivatized nanoparticles were prepared, they were mounted in the microfluidic cell and then buffer and DNA oligonucleotides mimicking miR-17 were circulated at 5  $\mu\text{l}/\text{min}$  via a computer-controlled peristaltic pump. In order to work in more manageable conditions, our tests were performed with target DNA with the same sequence as the RNA sequences. We assume that our analytical system could be easily tunable to RNA detection at a later stage. An example of the real-time measurement of the centroid of the plasmonic peak is reported in Figure 1B (together with example plasmonic spectra in Fig. 1A). The binding of miR-17 target led to a progressive shift of the centroid position over time. After flowing the analyte solution, a small amount of washing buffer was circulated in order to allow a differential measurement of the centroid shift in the same solution (refractive index) as the baseline (as indicated by the black bracket in Figure 1B). After each measurement cycle, the biosensor surface was regenerated by flowing 20 mM HCl (as in (Zopf et al. 2019)) and verifying that the baseline centroid location was obtained again. A typical calibration curve of the system sensitivity is displayed in Figure 2 and was obtained from repeated measurements with varying concentrations of miR-17 target sequence, flowed at the same rate for the same time (10 min). For the sake of comparison of the signal, the shifts of the centroids of the plasmonic peaks were normalized to the shift in response to 1  $\mu\text{M}$  analyte. The biosensor response to the miR-17 target is linear with the log of the target



concentration in the 1-1000 nM range (normalized  $\Delta\text{centroid} = 0.31 \cdot \log(\text{conc.}/\text{nM}) + 0.05$  with  $R^2 = 0.993$ ).

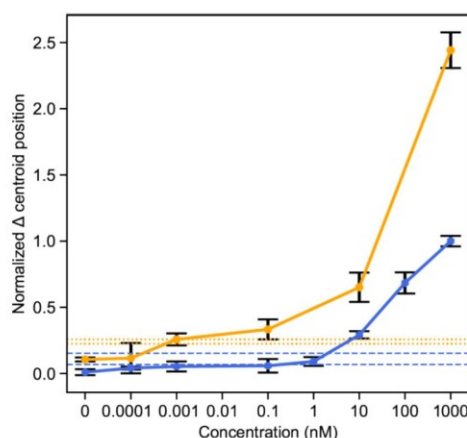


Figure 2. Calibration curve for the response of the miRNA biosensor, with and without HCR. Different concentrations of target miR-17 in running buffer were flowed in the chamber followed by injection of the mixture of hairpins at 0.5  $\mu\text{M}$  each in running buffer for 30 minutes. The blue trace represents the calibration curve for the response to the target only, while the yellow trace represents the cumulative response after HCR amplification. The lower and upper dashed horizontal blue lines correspond to the LOD and the LOQ, respectively, for the biosensor response without HCR. The lower and upper dotted yellow horizontal lines represent the LOD and LOQ for the biosensor response with HCR amplification. The bars correspond to the standard deviations ( $N = 3$ ).

The effect of HCR on the calibration curve of the biosensor was tested by performing HCR after the exposure of the biosensor to known concentrations of the specific miR-17 target sequence (Figure 2, yellow bars). After the non-bound target was removed by washing with running buffer, HCR hairpins were flowed simultaneously through the measurement cell at a constant concentration (0.5  $\mu\text{M}$  for 0.5 h) for all the data points. This operation was performed via a peristaltic pump under computer control so that the overall operator effort was limited to setting up the apparatus. Including HCR made the measurement time 0.5 h longer to allow for the HCR molecular assembly to reach a plateau yield. Globally, the measurement procedure on a specimen took less than one hour. As shown in Figure 2, signal gains of about 2-fold for 1  $\mu\text{M}$  and 10 nM target concentration were recorded, while lower signals but due to slightly higher amplification ratios were recorded in the 1 pM – 1 nM range. Thereby, we can conclude that the HCR increased the sensitivity down to the pM target concentration range.

The hybridization chain reaction is often affected by some target-less *leakage* (the self-triggered assembly of the monomers) due to the metastable state of the hairpin monomers. The negative control (only buffer instead of target analyte exposed on the probe) shows a very low signal increase when the HCR hairpins are later circulated (Fig. 2). Since the chips were properly passivated (see Fig. S13), this is probably due to some weak leakage that could not be suppressed while designing hairpins for the natural miR-17 sequence. The use of hairpins at the relatively low 0.5  $\mu\text{M}$

concentration stems from the compromise between a reasonable rate of the HCR and low enough leakage.

All the operations for the measurement on a specimen are complete within approximately one hour, and a volume of 50  $\mu\text{L}$  of the solution containing the specific target is enough to obtain a measurement point. We showed that it is also possible to reuse the biosensors as to allow for higher productivity/sensor (see Fig. S10): this aspect could be useful towards research bioanalytics or environmental testing, but it is certainly not advisable in diagnostics in order to avoid cross-contaminations.

The Student t-test was performed to confirm that the measurements after HCR are statistically different from those before HCR ( $P \leq 0.01$ ) in the 1 pM-1  $\mu\text{M}$  concentration range. With the hybridization chain reaction, an improvement of 3 orders of magnitude for the limit of detection (LOD) and the limit of quantification (LOQ) of the sensing (Fig. 2) was verified. The limit of detection for the LSPR biosensor before the amplification step was estimated at 1 nM, with a limit of quantification of about 10 nM. HCR reduced the LOD and the LOQ to about 1 pM, suggesting an effective advantage of HCR as an amplification method (Fig. 2). These LOD and LOQ values are in the proper range for miRNA detection in bodily fluids, where the concentrations are expected to range from femtomolar to nanomolar (Zouari et al. 2018). The LOD was estimated as the lowest (measured) target concentration with a signal higher than the signal of the blank added to 3 times its standard deviation. The LOQ was estimated adding the signal of the blank to 10 times its standard deviation (Alankar and Vipin B 2011). As the volume of each target analyte injection was 50  $\mu\text{L}$ , the LSPR biosensor can detect about 50 attomoles of miRNA. The ability to operate with such small volumes of diluted miRNA solution should make our biosensor method compliant with the available volumes of patient specimens derived from liquid biopsies and the needed sample pre-processing and extraction procedures.

Previously reported LSPR based method could reach slightly lower LODs than those reported here, however they employed much more complicated setups and procedures. Ki et al. reported detecting 2.6 attomoles in a 200  $\mu\text{L}$  sample, using complex nanostructured LSPR chips in combination with enzymatic substrate precipitation. The analysis time of the miRNA sensing platform, as commented by the authors themselves, was too long for direct assay as a POC diagnostic tool in clinical application (Ki et al. 2019). Our approach could achieve a similar range of sensitivity, and further technical improvements are possible. The strategy reported by Joshi et al. for miRNA detection yielded a limit of detection of about 30 fM. It requires peculiar gold nanostructures and longer analysis times (Joshi et al. 2014). Moreover, the authors use a linear single-stranded probe and it is not clear if the system can distinguish homologous miRNA sequences: a critical issue as diagnostic detection deals with a complex miRNA mix (*vide infra* our tests for non-target sequences). Na et al. presented a LSPR assay using HCR and DNAzyme activity as a double amplification, reaching a limit of detection of about 2 pM in buffer, not far from our findings. Their overall protocol required complex manipulation, transfer of the samples and time-consuming incubations (Na et al. 2018). We can thus conclude that our proposed biosensor can represent a viable result of simplicity, scalability and performance that should prove useful towards the POC sensing of miRNA of diagnostic interest. Further comparison with the available literature is presented in Table S1.

The specific hairpin monomers H1 and H2 here employed were designed for miR-17 detection (Miti and Zuccheri 2018). Their self-assembly was first demonstrated by us through experiments in solution (see Fig. S4). An important issue in microRNA detection is the discrimination between similar sequences. The specificity of the system in solution was verified by testing the detection in the presence of miR-106b, with high sequence homology with miR-17, and in the presence of several other unrelated miRNA sequences (see Fig. S5 and S6).

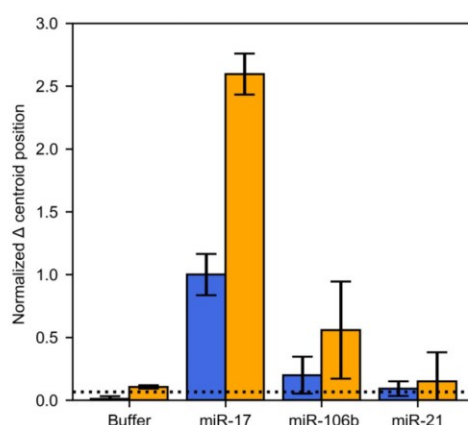


Figure 3. Normalized average shift in the centroid position corresponding to miRNA sequence detection (blue bars) and overall response performing HCR (orange bars). Error bars correspond to standard deviation ( $N = 3$ ). The black line corresponds to the LOD (before HCR) as defined in Fig. 1 and in the main text. Error bars correspond to standard deviation ( $N = 3$ )

In order to test for the specificity of the LSPR biosensor detection, miR-21 and miR-106b non-target sequences were used (Fig. 3). miR-21 is another commonly dysregulated miRNA in diseases such as cancer (Wu et al. 2015), while, as mentioned above, miR-106b holds a very close sequence similarity to miR-17 (see Table S1) so it was tested as a possible challenging interferent. The LSPR measurements of the alternative analytes were performed in the same conditions as the miR-17 targets ( $1 \mu\text{M}$  conc.) and the results are displayed in Figure 3 (blue bars). The system designed for detecting miR-17 displays a significantly higher signal (5-fold higher) as a response to miR-17 than to the highly homologous miR-106b and an even higher signal (10-fold) with respect to the same concentration of miR-21, which gave a barely detectable signal. Not only the signal due to the highly homologous miR-106b is much lower than that due to miR-17, but the kinetics of the change in the LSPR signal was also markedly different (see Fig. S11).

As also described before, a second biosensor signal was then recorded after performing HCR for miR-17 to test for the extent and specificity of signal amplification. As showed in Figure 3, HCR led to a significantly higher signal in the case of the specific target (2.5 fold higher). In the case of a non-specific binding,



such as for miR-106b and miR-21, HCR still amplified the signal to some lower extent.

The surface probe used for the detection throughout all the reported experiments was a 5'-thiolated version of the H1 hairpin, including a short spacer to optimize the exposure of the probe to the solution and minimize the influence of the surface on the stability of the H1 hairpin structure. The use of a hairpin-like probe implies an energy penalty for a non-specific binding, due to the stable secondary structure of the hairpin stem that protects at least part of the recognition sequence. Such a structure makes the probe more resilient to errors in the recognition. For these reasons, and for the possibility to elicit signals from their conformational transitions, they are widely employed in sensing applications, including strategies involving so-called E-DNA or molecular beacons (Du et al. 2005; Huang et al. 2015; Jiao et al. 2020; Wei et al. 2020). Generally, an unspecific sequence should not be able to unpair the hairpin, while the most specific complementary sequence induces the switch in the conformation, triggering the self-assembly. The advantages of using a hairpin probe have been suggested also by thermodynamic analysis in NUPACK (Zadeh et al. 2011): a linear single stranded probe for miR-17 would easily interact with miR-106b, while, on the other hand, the theoretical analysis suggested a much lower probability of interaction between hairpin H1 and miR-106b, especially if compared to the interaction with the specific target. This was confirmed by the experiments in solution that reported a very high specificity in the triggering with miR-17 vs. miR-106b (see Fig. S5). The hairpin was designed to interact at the 3' terminus of the miRNA: this region has been observed to be more variable in miRNAs, and, in particular, miR-106b misses two bases at the 3' terminus, in addition to a guanine replaced with an adenine in the same region. These differences should impair the formation of the complex with H1, enhancing the specificity. Moreover, even in the case the global stability of the miR-106b – H1 complex were sufficient, a much slower assembly kinetics is expected, as this is strongly affected by the base pairing at the hairpin toehold.

A visible HCR enhancement of the LSPR is also measured when testing for the non-specific miR-106b, albeit on a lower signal (Fig. 3). We can hypothesize that the immobilization of the probe on the gold surface could have an effect on the stability of the hairpin: the density and the steric hindrance on the surface of the gold nanoparticles may slightly enhance the switching of H1 to a partially open conformation, more prone to non-specific triggering than the same sets of sequences that were tested in solution (see Fig. 2 vs. Fig. S5). Even if the specificity of the surface-bound hairpin probe was lower than in solution, our biosensor could clearly discriminate the specific miR-17 target from miR-106b, the most homologous sequence found in the miRNA databases.

It can be estimated that the plasmonic properties of 80 nm gold nanoparticles in this conditions are sensitive to the neighboring solution environment up to a distance of about 40 nm (Jacqueline Jatschka 2016). Consequently, it can be expected that the assembly of only up to 4 or 5 pairs of HCR hairpins could be detected in LSPR, based on the expected extension from the surface of a dsDNA in a crowded layer and on measuring the LSPR signal when performing HCR in a step-by-step manner (see Fig. S12). From our previous measurements (Spiga et al. 2014), it could be seen that surface-bound HCR can exceed such assembly lengths. While using LSPR, it is thus not crucial to maximize the HCR assembly yield as this should not lead to a

significant improvement of the reported signal amplification factor. On the other hand, this implies that the HCR time could be reduced with respect to other set-ups, to the advantage of the rapidity of the assay.

In our experimental set-up, the measurements and the fluidics are fully automated using pumps under the control of a custom-made software. A further obvious development of the sensing strategy and the measurement apparatus could entail the multiplexed HCR and measurement over a small number of miRNA-specific probes. In such envisaged development, the calibration of the system with non-specific miRNAs should allow for the subtraction of cross-over readings and improve the sequence specificity further from what reported here. This development is not expected to require novel technological components. Spherical gold nanoparticles are easily accessible, while light sources and spectrophotometers can be miniaturized allowing the portability and applicability in point-of-care clinical analysis.

#### 4. Conclusions

We herein presented the novel combination of hybridization chain reaction and LSPR based sensing towards the specific detection of short nucleic acids, such as circulating miRNA. We showed that our biosensing strategy is amenable to the detection of the diagnostically relevant miR-17 in quantities and concentrations relevant for assaying liquid patient biopsies. Furthermore, it is robust in the presence of other interfering miRNA sequences, as a mix of miRNAs are expected to be always present in the samples processed from patients' bodily fluids. In our implementation, the full measurement procedure of one specimen can take less than 1 hour.

In our hands, LSPR has been proven as a flexible platform in DNA-based sensing for detecting nucleic acids, while it could also be exploited towards other targets (Jacqueline Jatschka 2016; Schneider et al. 2013; Soares et al. 2014; Zopf et al. 2019). Its use is intrinsically simple since it does not require perishable enzymes, sophisticated temperature control, or additional complicated procedures. Envisaged further developments of the apparatus fluidics and optical detection can multiplex the detection system as to allow the simultaneous specific and sensitive detection of a panel of diagnostically-relevant miRNA within the same response time in the context of point-of-care diagnostics.

## Acknowledgements

We thankfully acknowledge Desiree Braun for the sensor chip preparation. This study was funded by DFG (FKZ: FR 1348/31-1), and NanoWater (BMBF, FKZ: 02WIL1521).

## References

- World Cancer Report 2020. World Cancer Report: cancer research for cancer prevention. In: Wild, C., Weiderpass, E., Stewart, B. (Eds.). International Agency for Research on Cancer, Lyon.
- Abi, A., Mohammadpour, Z., Zuo, X.L., Safavi, A., 2018. Nucleic acid-based electrochemical nanobiosensors. *Biosensors & Bioelectronics* 102, 479-489.
- Alankar, S., Vipin B, G., 2011. Methods for the determination of limit of detection and limit of quantitation of the analytical methods 2(1), 21-25.
- Augsburger, E.E., Rana, M., Yigit, M.V., 2018. Chemical and Biological Sensing Using Hybridization Chain Reaction. *Acs Sensors* 3(5), 878-902.
- Aushev, V.N., Zborovskaya, I.B., Laktionov, K.K., Girard, N., Cros, M.P., Herceg, Z., Krutovskikh, V., 2013. Comparisons of microRNA Patterns in Plasma before and after Tumor Removal Reveal New Biomarkers of Lung Squamous Cell Carcinoma. *Plos One* 8(10), 10.
- Bi, S., Yue, S.Z., Zhang, S.S., 2017. Hybridization chain reaction: a versatile molecular tool for biosensing, bioimaging, and biomedicine. *Chemical Society Reviews* 46(14), 4281-4298.
- Bianchi, F., Nicassio, F., Marzi, M., Belloni, E., Dall'Olio, V., Bernard, L., Pelosi, G., Maisonneuve, P., Veronesi, G., Di Fiore, P.P., 2011. A serum circulating miRNA diagnostic test to identify asymptomatic high-risk individuals with early stage lung cancer. *Embo Molecular Medicine* 3(8), 495-503.
- Bianchi, F., Nicassio, F., Veronesi, G., di Fiore, P.P., 2012. Circulating microRNAs: next-generation biomarkers for early lung cancer detection. *Ecancermedicalscience* 6, 246.
- Boeri, M., Verri, C., Conte, D., Roz, L., Modena, P., Facchinetti, F., Calabro, E., Croce, C.M., Pastorino, U., Sozzi, G., 2011. MicroRNA signatures in tissues and plasma predict development and prognosis of computed tomography detected lung cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108(9), 3713-3718.
- Calin, G.A., Croce, C.M., 2006. MicroRNA signatures in human cancers. *Nature Reviews Cancer* 6(11), 857-866.
- Cappi, G., Accastelli, E., Cantale, V., Rampi, M.A., Benini, L., Guiducci, C., 2013. Peak shift measurement of localized surface plasmon resonance by a portable electronic system. *Sensors and Actuators B-Chemical* 176, 225-231.
- Cappi, G., Spiga, F.M., Moncada, Y., Ferretti, A., Beyeler, M., Bianchessi, M., Decosterd, L., Buclin, T., Guiducci, C., 2015. Label-Free Detection of Tobramycin in Serum by Transmission-Localized Surface Plasmon Resonance. *Analytical Chemistry* 87(10), 5278-5285.
- Chandra, S., Vimal, D., Sharma, D., Rai, V., Gupta, S.C., Chowdhuri, D.K., 2017. Role of miRNAs in development and disease: Lessons learnt from small organisms. *Life Sciences* 185, 8-14.

- Chao, J., Zhu, D., Zhang, Y.N., Wang, L.H., Fan, C.H., 2016. DNA nanotechnology-enabled biosensors. *Biosensors & Bioelectronics* 76, 68-79.
- Chen, H.J., Kou, X.S., Yang, Z., Ni, W.H., Wang, J.F., 2008. Shape- and size-dependent refractive index sensitivity of gold nanoparticles. *Langmuir* 24(10), 5233-5237.
- Cortez, M.A., Bueso-Ramos, C., Ferdin, J., Lopez-Berestein, G., Sood, A.K., Calin, G.A., 2011. MicroRNAs in body fluids-the mix of hormones and biomarkers. *Nature Reviews Clinical Oncology* 8(8), 467-477.
- Csaki, A., Stranik, O., Fritzsche, W., 2018. Localized surface plasmon resonance based biosensing. *Expert Review of Molecular Diagnostics* 18(3), 279-296.
- Dahlin, A.B., Tegenfeldt, J.O., Hook, F., 2006. Improving the instrumental resolution of sensors based on localized surface plasmon resonance. *Analytical Chemistry* 78(13), 4416-4423.
- Deng, R.J., Zhang, K.X., Li, J.H., 2017. Isothermal Amplification for MicroRNA Detection: From the Test Tube to the Cell. *Accounts of Chemical Research* 50(4), 1059-1068.
- Dirks, R.M., Pierce, N.A., 2004. Triggered amplification by hybridization chain reaction. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101(43), 15275-15278.
- Du, H., Strohsahl, C.M., Camera, J., Miller, B.L., Krauss, T.D., 2005. Sensitivity and specificity of metal surface-immobilized "molecular beacon" biosensors. *J. Am. Chem. Soc.* 127(21), 7932-7940.
- Dyson, G., Ferran, B., Bolton, S., Craig, D.B., Dombkowski, A., Beebe-Dimmer, J.L., Powell, I.J., Podgorski, I., Heilbrun, L.K., Bock, C.H., 2018. The extrema of circulating miR-17 are identified as biomarkers for aggressive prostate cancer. *American Journal of Cancer Research* 8(10), 2088-+.
- Eichelsner, C., Flesch-Janys, D., Chang-Claude, J., Pantel, K., Schwarzenbach, H., 2013. Deregulated Serum Concentrations of Circulating Cell-Free MicroRNAs miR-17, miR-34a, miR-155, and miR-373 in Human Breast Cancer Development and Progression. *Clinical Chemistry* 59(10), 1489-1496.
- Fong, K.E., Yung, L.Y.L., 2013. Localized surface plasmon resonance: a unique property of plasmonic nanoparticles for nucleic acid detection. *Nanoscale* 5(24), 12043-12071.
- Graybill, R.M., Bailey, R.C., 2016. Emerging Biosensing Approaches for microRNA Analysis. *Analytical Chemistry* 88(1), 431-450.
- Hesari, A., Azizian, M., Darabi, H., Nesaei, A., Hosseini, S.A., Salarinia, R., Motaghi, A.A., Ghasemi, F., 2019. Expression of circulating miR-17, miR-25, and miR-133 in breast cancer patients. *Journal of Cellular Biochemistry* 120(5), 7109-7114.
- Huang, J.H., Wu, J.Q., Li, Z.G., 2015. Biosensing using hairpin DNA probes. *Reviews in Analytical Chemistry* 34(1-2), 1-27.
- Hwang, H.W., Mendell, J.T., 2006. MicroRNAs in cell proliferation, cell death, and tumorigenesis. *British Journal of Cancer* 94(6), 776-780.
- Jacqueline Jatschka, A.D., Andrea Csáki, Wolfgang Fritzsche, Ondrej Stranik, 2016. Propagating and localized surface plasmon resonance sensing—A critical comparison based on measurements and theory. pp. 62-70. *Sensing and Bio-Sensing Research*.
- Jiao, J., Li, C., Ning, L.M., Shi, L., Wang, L., Xiang, Y., Li, G.X., 2020. Electrochemical detection of circRNAs based on the combination of back-splice junction and duplex-specific nuclease. *Sensors and Actuators B-Chemical* 302.

- Joshi, G.K., Deitz-McElyea, S., Johnson, M., Mali, S., Korc, M., Sardar, R., 2014. Highly Specific Plasmonic Biosensors for Ultrasensitive MicroRNA Detection in Plasma from Pancreatic Cancer Patients. *Nano Letters* 14(12), 6955-6963.
- Jung, L.S., Campbell, C.T., Chinowsky, T.M., Mar, M.N., Yee, S.S., 1998. Quantitative interpretation of the response of surface plasmon resonance sensors to adsorbed films. *Langmuir* 14(19), 5636-5648.
- Ki, J., Lee, H.Y., Son, H.Y., Huh, Y.M., Haam, S., 2019. Sensitive Plasmonic Detection of miR-10b in Biological Samples Using Enzyme-Assisted Target Recycling and Developed LSPR Probe. *Acs Applied Materials & Interfaces* 11(21), 18923-18929.
- Kral, J., Korenkova, V., Novosadova, V., Langerova, L., Schneiderova, M., Liska, V., Levy, M., Veskrnova, V., Spicak, J., Opatova, A., Jiraskova, K., Vymetalkova, V., Vodicka, P., Slysikova, J., 2018. Expression profile of miR-17/92 cluster is predictive of treatment response in rectal cancer. *Carcinogenesis* 39(11), 1359-1367.
- Lamb, L.E., Bartolone, S.N., Ward, E., Chancellor, M.B., 2020. Rapid Detection of Novel Coronavirus (COVID19) by Reverse Transcription-Loop-Mediated Isothermal Amplification. Available at SSRN: <https://ssrn.com/abstract=3539654> or <http://dx.doi.org/10.2139/ssrn.3539654>.
- Liu, P., Yang, X.H., Sun, S., Wang, Q., Wang, K.M., Huang, J., Liu, J.B., He, L.L., 2013. Enzyme-Free Colorimetric Detection of DNA by Using Gold Nanoparticles and Hybridization Chain Reaction Amplification. *Analytical Chemistry* 85(16), 7689-7695.
- Miti, A., Zuccheri, G., 2018. Hybridization Chain Reaction Design and Biosensor Implementation. In: Zuccheri, G. (Ed.), *DNA Nanotechnology: Methods and Protocols*, pp. 115-135. Springer New York, New York, NY.
- Momi, N., Kaur, S., Rachagani, S., Ganti, A.K., Batra, S.K., 2014. Smoking and microRNA dysregulation: a cancerous combination. *Trends Mol. Med* 20(1), 36-47.
- Na, H.K., Wi, J.S., Son, H.Y., Ok, J.G., Huh, Y.M., Lee, T.G., 2018. Discrimination of single nucleotide mismatches using a scalable, flexible, and transparent three-dimensional nanostructure-based plasmonic miRNA sensor with high sensitivity. *Biosensors & Bioelectronics* 113, 39-45.
- Parab, H.J., Jung, C., Lee, J.H., Park, H.G., 2010. A gold nanorod-based optical DNA biosensor for the diagnosis of pathogens. *Biosensors & Bioelectronics* 26(2), 667-673.
- Qin, X., Xu, H.S., Gong, W.R., Deng, W.B., 2015. The tumor cytosol miRNAs, fluid miRNAs, and exosome miRNAs in lung cancer. *Frontiers in Oncology* 4, 7.
- Schneider, T., Jahr, N., Jatschka, J., Csaki, A., Stranik, O., Fritzsche, W., 2013. Localized surface plasmon resonance (LSPR) study of DNA hybridization at single nanoparticle transducers. *Journal of Nanoparticle Research* 15(4).
- Sethi, S., Ali, S., Sarkar, F.H., 2014. MicroRNAs in personalized cancer therapy. *Clinical Genetics* 86(1), 68-73.
- Soares, L., Csaki, A., Jatschka, J., Fritzsche, W., Flores, O., Franco, R., Pereira, E., 2014. Localized surface plasmon resonance (LSPR) biosensing using gold nanotriangles: detection of DNA hybridization events at room temperature. *Analyst* 139(19), 4964-4973.
- Spiga, F.M., Bonyar, A., Ring, B., Onofri, M., Vinelli, A., Santha, H., Guiducci, C., Zuccheri, G., 2014. Hybridization chain reaction performed on a metal surface as a means of signal amplification in SPR and electrochemical biosensors. *Biosensors & Bioelectronics* 54, 102-108.
- Tavallaie, R., De Almeida, S.R.M., Gooding, J.J., 2015. Toward biosensors for the detection of circulating microRNA as a cancer biomarker: an overview of the



- challenges and successes. *Wiley Interdisciplinary Reviews-Nanomedicine and Nanobiotechnology* 7(4), 580-592.
- Thamm, S., Csàki, A., Fritzsche, W., 2018. LSPR Detection of Nucleic Acids on Nanoparticle Monolayers. In: Zuccheri, G. (Ed.), *DNA Nanotechnology: Methods and Protocols*, pp. 163 - 171. Springer New York, New York, NY.
- Turchinovich, A., Weiz, L., Langheinz, A., Burwinkel, B., 2011. Characterization of extracellular circulating microRNA. *Nucleic Acids Research* 39(16), 7223-7233.
- Vidigal, J.A., Ventura, A., 2015. The biological functions of miRNAs: lessons from in vivo studies. *Trends in Cell Biology* 25(3), 137-147.
- Wei, X.T., Liu, D.W., Zhao, M., Yang, T.T., Fan, Y.P., Chen, W.Q., Liu, P., Li, J.B., Ding, S.J., 2020. An enzyme-free surface plasmon resonance imaging biosensing method for highly sensitive detection of microRNA based on catalytic hairpin assembly and spherical nucleic acid. *Analytica Chimica Acta* 1108, 21-27.
- Willems, K.A., Van Duyne, R.P., 2007. Localized surface plasmon resonance spectroscopy and sensing. *Annual Review of Physical Chemistry* 58, 267-297.
- Wu, K.L., Li, L.W., Li, S.Y., 2015. Circulating microRNA-21 as a biomarker for the detection of various carcinomas: an updated meta-analysis based on 36 studies. *Tumor Biology* 36(3), 1973-1981.
- Yockell-Lelièvre, H., Lussier, F., Masson, J.-F., 2015. Influence of the Particle Shape and Density of Self-Assembled Gold Nanoparticle Sensors on LSPR and SERS. *Journal of Physical Chemistry C* 119(51), 28577-28585.
- Zadeh, J.N., Steenberg, C.D., Bois, J.S., Wolfe, B.R., Pierce, M.B., Khan, A.R., Dirks, R.M., Pierce, N.A., 2011. NUPACK: Analysis and Design of Nucleic Acid Systems. *Journal of Computational Chemistry* 32(1), 170-173.
- Zeng, Q.H., Jin, C.H., Chen, W.H., Xia, F., Wang, Q., Fan, F., Du, J., Guo, Y.H., Lin, C.W., Yang, K.Y., Li, J.J., Peng, X.W., Li, X.R., Cao, K., 2014. Downregulation of serum miR-17 and miR-106b levels in gastric cancer and benign gastric diseases. *Chinese Journal of Cancer Research* 26(6), 711-716.
- Zhang, Y., Zhang, Y.M., Yin, Y.H., Li, S.H., 2019. Detection of circulating exosomal miR-17-5p serves as a novel non-invasive diagnostic marker for non-small cell lung cancer patients. *Pathology Research and Practice* 215(8).
- Zopf, D., Pittner, A., Dathe, A., Grosse, N., Csaki, A., Arstila, K., Toppari, J.J., Schott, W., Dontsov, D., Uhlrich, G., Fritzsche, W., Stranik, O., 2019. Plasmonic Nanosensor Array for Multiplexed DNA-based Pathogen Detection. *Acs Sensors* 4(2), 335-343.
- Zouari, M., Campuzano, S., Pingarron, J.M., Raouafi, N., 2018. Amperometric Biosensing of miRNA-21 in Serum and Cancer Cells at Nanostructured Platforms Using Anti-DNA-RNA Hybrid Antibodies. *Acs Omega* 3(8), 8923-8931.



## Supplementary information for:

### **A MiRNA biosensor based on localized surface plasmon resonance enhanced by surface-bound hybridization chain reaction**

Andrea Miti, Sophie Thamm, Philipp Muller, Andrea Csàki, Wolfgang Fritzsche, Giampaolo Zuccheri

A. Miti, G. Zuccheri,

Department of Pharmacy and Biotechnology, University of Bologna, Italy

S3 Center, Institute of Nanoscience of the Italian CNR3

Sophie Thamm, Philipp Muller, Andrea Csàki, Wolfgang Fritzsche

Leibniz Institute of Photonic Technology, Albert-Einstein-Str. 9, 07745 Jena, Germany

S1.	Review of the recent related bioanalytical methods.....	2
S2.	Reagents and buffers .....	3
S3.	Oligonucleotide sequences and thermodynamic analysis of their structures .....	3
S4.	Preliminary and additional experiments of HCR in solution .....	6
S5.	Extended methods section on LSPR and additional results.....	10
S5.1	LSPR Chip preparation .....	10
S5.2	Measurement procedures .....	11
S6.	References.....	19

## S1. Review of the recent related bioanalytical methods

In the table below, a literature review highlighting the related bioanalytical procedures available in the scientific literature and known to us. In the remarks column is a brief summary of the advantages and drawbacks of the literature procedures in order to make a comparison with the one presented in this communication. The review is made to include papers exploiting HCR in a label-free approach.

Analytical method	Strategy	Target	Sensitivity (LOD)	Remarks	Reference
Fluorescence	Label-free, SiNPs fluorescence quenching and HCR signal amplification with G-quadruplex	miRNA let-7a	2.5 pM	Does not require enzymes, no laboring procedures, selective. Requires hours (2h hours incubation at 37°C) and several additions of reagents.	Ding et al 2018
SPR	Label-free, non-linear HCR	PML/RAR $\alpha$	0.72 pM	No enzymes involved, good specificity and sensitivity. More complex self-assembly, requires SPR analytical system.	Guo et al 2017
SPR / electrochemical	Label-free, HCR	Pathogen DNA	1 nM (10-100 fmoles) (SPR) 0.1-0.5 $\mu$ M (Capacitive)	Compatible with miniaturized and multiplexed parallel sensing. Low sensitivity, SPR instrumentation required.	Spiga et al 2014
Colorimetric	Label-free, AuNps in solution	Short DNA target	50 pM (spectroscopic) 100 pM (visual)	Simple in procedures and relatively quick (1 h). Not applied to a real target sequence.	Liu et al 2013
Electrochemical	Label-free, nanopore membrane utilizing HCR	Survivin mRNA	30 fM	Good sensitivity. Several hours required	Zhao et al 2017
Electrochemical	Label-free, MetB, ITO surface	miRNA let-7a	1 pM	Simple, enzyme-free, immobilization of the probe is not required. Requires incubation at 37°C	Hou et al 2015
Electrochemical	Label-free, DNA hydrogel combining HCR and DNAzyme assisted recycling	Hg <sup>2+</sup>	0.042 pM	Sensitive, evaluation of Hg <sup>2+</sup> in real samples. Requires DNAzyme recycle step and hydrogel polymerization	Cai et al 2017
Electrochemical	Label-free, AgNCs	miR-199a	0.64 fM	High sensitivity, good selectivity. TAPNR amplification, AgNCs synthesis required during the detection	Yang et al 2015
Acoustic detection	Branched HCR in solution	DNA	25 nM	No enzymes or thermal cycles required Low sensitivity	Xu et al 2019

Label-free biosensing does not require the labeling of the target molecule to perform the detection, since intrinsic properties of the target such as size, charge or molecular weight can be exploited. Hybridization Chain Reaction can be adapted to such approaches in different ways. The DNA nanostructure assembled in the process can be easily labeled in place of the target through additional reagents or by modifying the HCR monomers in order to return an enhanced response (Yang et al 2015, Hou et al 2015, Ding et al 2018). Alternatively, the HCR product can simply further enhance changes in physical properties due to the target recognition. That is the case of methods based on Surface Plasmon Resonance (SPR), electrical impedance, Nanopores based strategies and acoustic detection (Guo et al 2017, Spiga et al 2014, Zhao et al 2017, Cai et al 2017, Xu et al 2019). The procedure we propose in this communication based on Localized Surface Plasmon Resonance has the same advantages as the latter, simple in principle and cost-effective.

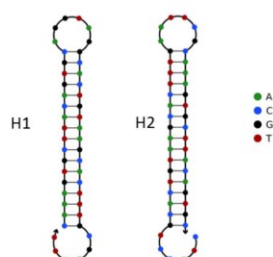
## S2. Reagents and buffers

Reagents and chemicals used during the work were purchased at Merck KGaA (Darmstadt, Germany) and used without any further purification unless specified. All buffers used during this work were prepared in ultrapure water (18 M $\Omega$ ·cm). Oligonucleotides (Table S1) were purchased at Eurofins Genomics Germany GmbH (Ebersberg, Germany) and biomers.net GmbH (Ulm, Germany). HCR buffer: 0.5 M NaCl, 50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 6.8: Citrate Buffer (adsorption buffer): 0.5 M trisodium citrate dihydrate, pH 6.0 (with HCl). Running buffer: HCR buffer 0.75 M NaCl, 75 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 6.8 (with HCl). 1 mM 6-mercapto-1-hexanol (MCH) in running buffer; HCl 20 mM in ultrapure water. All buffers and solution were additionally filtered with 0.2  $\mu$ m filters before use. Immobilization buffer: Citrate Buffer 0.5 M pH 6.0. Spherical Gold Nanoparticles 80 nm in diameter (OD<sub>520</sub> 1, c = 2.89 $\times$ 10<sup>-4</sup> M, 1.10 $\times$ 10<sup>10</sup> P/mL) by BBI Solutions (Crumlin, UK).

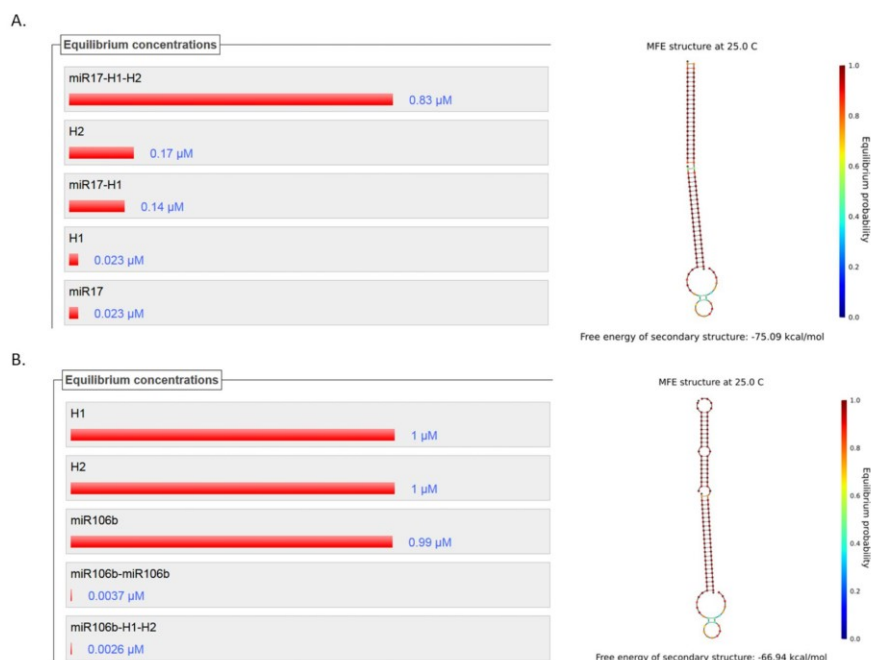
## S3. Oligonucleotide sequences and thermodynamic analysis of their structures

Strand	Sequence (5' > 3')	nt
miR-17	CAAAGTGCTTACAGTGCAGGTAA	23
miR-106b	TAAAGTGCTGACAGTGCAGAT --	21
miR-21	TAGCTTATCAGACTGATGTTGA	22
H1	CTACCTGCACTGTAAGCACTTTGAATTCGCAAAGTGCTTACAGTGC	46
H2	CAAAGTGCTTACAGTGCAGGTAGGCACTGTAAGCACTTTGCGAATT	46
H1_probe	SH(CH) <sub>6</sub> -TTTTCTACCTGCACTGTAAGCACTTTGAATTCGCAAAGTGCTTACAGTGC	50

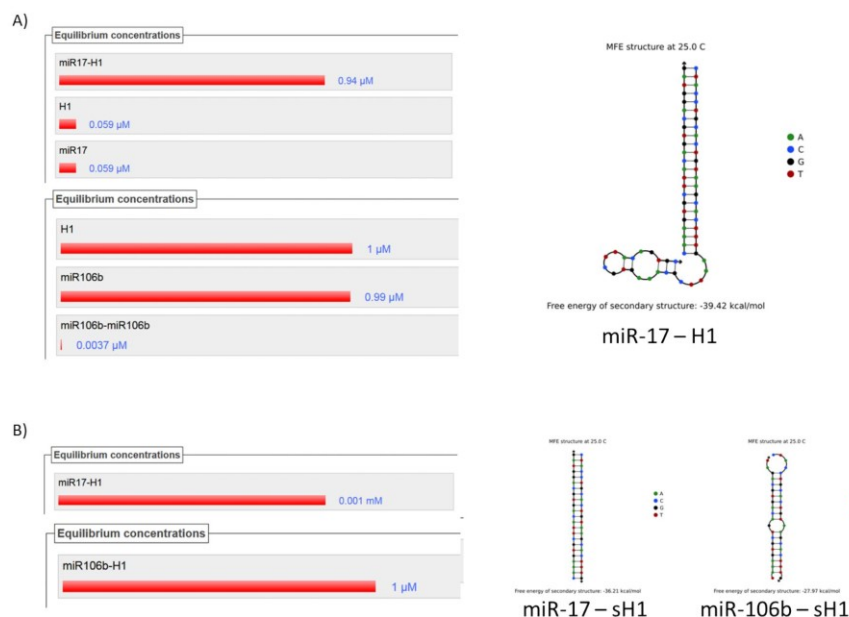
**Table S1.** Sequences of the oligonucleotides.



**Figure S1.** Hairpins H1 and H2 used as monomers of the Hybridization Chain Reaction specific for miR-17



**Figure S2.** NUPACK analysis of the interaction of H1 and H2 with miR-17 and miR-106b sequences. Here we focused on the first complex involving the three species H1, H2 and miRNA. This would be the first complex triggering required for the nanostructure to grow. A) Analysis of the mixture miR-17 + H1 + H2, 1:1:1, 1 μM concentration. The barplot shows the theoretical concentration of each species at the equilibrium. The formation of the complex miR-17-H1-H2 is favored in these conditions suggesting the correct behavior in triggering the self-assembly. This complex is the preponderant with a  $\Delta G$  of -75.09 kcal/mol. The figure on the right depicts the minimum free energy structure of the complex, with the base pairing probability in color scale. B) Analysis of the formation of miR-106b-H1-H2. The probability of formation for such complex is much lower. The species are almost not involved in any interaction based on the thermodynamic evaluation returned by NUPACK. The small fraction of complex miR-106b-H1-H2 formed shows a  $\Delta G$  less favorable compared to the interaction with miR-17, -66.94. NUPACK analysis suggests thus a high capability of discrimination between miR-17 and miR-106b. This is also due to the stability of the interaction between H1 and miR-106b that is considered very improbable by the analysis tool (see also Fig S3).

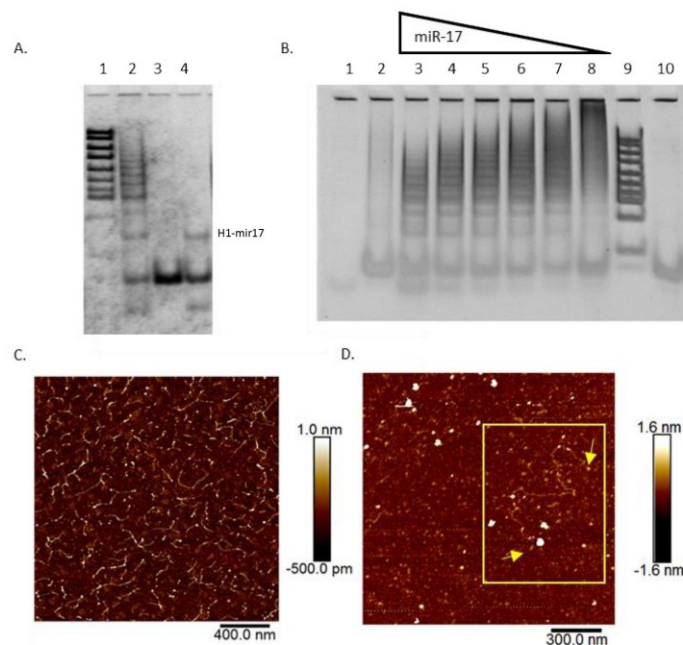


**Figure S3.** NUPAK thermodynamic analysis of the interaction of H1 with miR-17 and miR-106b sequences. A) Interaction between miR-17 and H1. The formation of miR-17-H1 complex is favored in the selected conditions leading to the structure showed on the right. As we can observe in the histogram, the interaction with miR-106b does not result in any complex involving the two species, predicted thus to stay in the individual form in solution. This suggests a high specificity in the interaction. B) We tried to perform the same analysis introducing an open sequence of H1. In this configuration, the differences in the sequence of miR-106b are not enough to impede the interaction with sH1 (single stranded H1). This result suggests the advantage of using a hairpin-like probe to enhance the specificity.

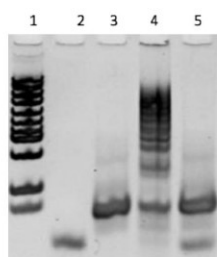
#### **S4. Preliminary and additional experiments of HCR in solution**

DNA oligonucleotides stock solutions (100  $\mu$ M) of targets and hairpins were diluted in PCR tubes in HCR buffer in general at 3-times the final concentration. Samples are then subjected to thermal treatment using a thermocycler (Thermo Scientific, PCR Sprint thermal cycler): 95°C for 5 min and allowed to cool down to 20°C in 1 h (0.02°C/sec). The proper volumes of solutions containing H1 and H2 hairpins were mixed, then a volume of target solution was added to the mixture. The reaction was incubated at least for 1 h at room temperature, unless specified. Electrophoresis gel analysis was performed through polyacrylamide gel electrophoresis in TBE 1X buffer: 89 mM Tris-boric acid, pH 8.0, 2 mM ethylenediaminetetraacetic acid tetrasodium salt (EDTA- $\text{Na}_4$ ). Polyacrylamide gels were prepared at 10% acrylamide in TBE 1X buffer (Acrylamide 40% acrylamide Acrylamide/bis-acrylamide, suitable for electrophoresis, 37.5:1). SYBR Gold (Nucleic Acid Gel Stain, Invitrogen) was then used to visualize the results using a Gel doc (Bio-Rad Gel doc 1000 System). AFM analysis of the HCR products obtained in solution were performed after a purification step. Samples were diluted 1/100 in TE 1X buffer (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA pH 8.0) and filtered with centrifugal filter units, MWCO 100 kDa (Amicon Ultra-0.5 mL centrifugal filters). The samples were then collected in HEPES buffer (10 mM NaCl, 5 mM  $\text{MgCl}_2$  pH 7.5). A 10  $\mu$ L aliquot was spread on a freshly-cleaved muscovite mica disc and left to adsorb for 5 min. The mica surface was then rinsed with ultrapure water and gently dried with nitrogen. Imaging for atomic force microscopy has been carried out using Multimode 8 NanoScope AFM in ScanAsyst Peakforce Tapping™ mode (Bruker).

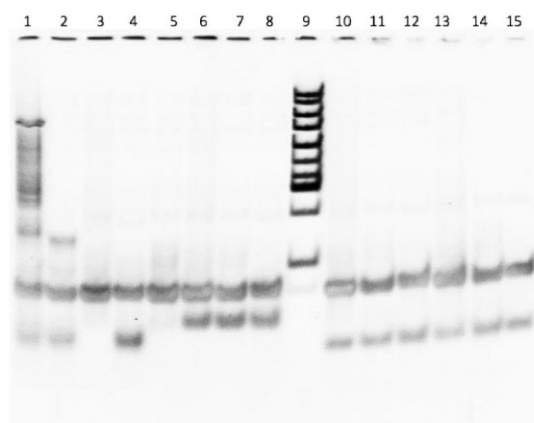




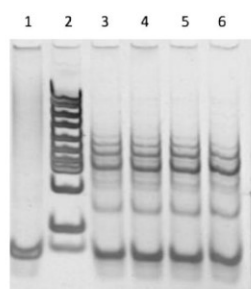
**Figure S4:** A) Gel electrophoresis showing HCR product (lane 2), the hairpins without target (lane 3) and the mixture H1 + miR-17 (lane 4). Lane 1: molecular weight DNA ladder. B) Section of gel electrophoresis showing the effect of target concentration on the HCR. Lane 1: miR-17; lane 2: hairpins H1 + H2; lane 3-8: miR-17 10  $\mu$ M, 3  $\mu$ M, 2  $\mu$ M, 1  $\mu$ M, 0.5  $\mu$ M, 0.1  $\mu$ M, with 1  $\mu$ M hairpins concentration. Lane 9: molecular weight DNA ladder; lane 10: H1. C) and D) Atomic force microscopy images showing the HCR products obtained in solution.



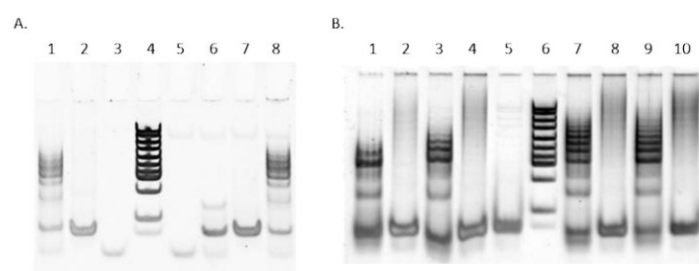
**Figure S5:** Polyacrylamide gel electrophoresis showing HCR performed with miR-17 and miR-106b, to compare the specificity. Equimolar conditions 1  $\mu$ M. Lane2, mir-17; lane 3, H1 and H2; lane 4, full mir-17 HCR; lane 5, failed HCR with 1  $\mu$ M mir-106b.



**Figure S6.** Additional assay of the specificity of mir-17 HCR in solution. Polyacrylamide gel electrophoresis analysis of the effect of non-specific unrelated sequences miR-30c, miR-140-5p and miR-486 in the presence of the mixture of hairpins. This was done to test the stability of the hairpins over sequences not related to the specific target miR-17. Lane 1: H1 + H2 + miR-17; lane 2: H1 + miR-17; lane 3: H1 + H2. Lane 4: H2 + miR-17; lane 5: H2; lane 6: H1 + H2 + miR-30c; lane 7: H1 + miR-30c; lane 8: H2 + miR-30c; lane 10: H1 + H2 + miR-140-5p; lane 11: H1 + miR-140-5p; lane 12: H2 + miR-140-5p; lane 13: H1 + H2 + miR-486; lane 14: H1 + miR-486; lane 15: H2 + miR-486.



**Figure S7.** Polyacrylamide gel electrophoresis analysis of the reaction product at different incubations times. Different hybridization chain reactions were started at different times before the electrophoretic analysis. HCR product at different incubation time within 2h. Lane 1: H1 + H2; lane 2: DNA ladder molecular weight marker; HCR products at lane 3 and higher: lane 3, 15 min; lane 4: 30 min; lane 5: 1 h; lane 6; 2 h.



**Figure S8.** A) Demonstration that HCR can also work in complex matrices. Polyacrylamide gel electrophoresis of the HCR product obtained in HCR buffer and in presence of 12.5 % (bovine serum albumin) BSA in HCR buffer to simulate the complex matrix of the blood serum. Lane 1: full HCR with mir-17; lane 2: H1 + H2; lane 3: miR-17; lane 4: DNA ladder molecular weight marker; lane 5: miR-17 in HCR buffer with 12.5 % BSA; H1 + miR-17 in HCR buffer with 12.5 % BSA; lane 7: H1 + H2 in HCR buffer with 12.5% BSA; lane 8: HCR in HCR buffer with 12.5 % BSA. B) Proof of the robustness of the designed HCR at different temperatures. Lane 1: HCR at 15 °C; lane 2: H1 + H2 at 15 °C; lane 3: HCR at 25 °C; lane 4: H1 + H2 at 25 °C; lane 5: H1 + H2; lane 6: DNA ladder molecular weight marker; lane 7: HCR at 35 °C; lane 8: H1 + H2 at 35 °C; lane 9: HCR at 45 °C; lane 10: H1 + H2 at 45 °C.

## S5. Extended methods section on LSPR and additional results

### S5.1 LSPR Chip preparation

The glass slides were carefully cleaned with a rinsing agent (soap) then subjected to multiple sonication: 10 min in Acetone, 10 min in Rotisol (denatured ethanol), 10 min in ethanol and 10 min in ultrapure water.

The glass slides were then dried with nitrogen flow, before plasma etching by oxygen plasma for 60 min, 380 W and 1.6 mbar to remove organic residues and activate them for the subsequent silanization (Oxygen plasma etcher 200G Plasma System by TePla GmbH, Wetzlar, Germany). The affinity between the glass surface and the gold nanoparticles was increased with aminosilanes.

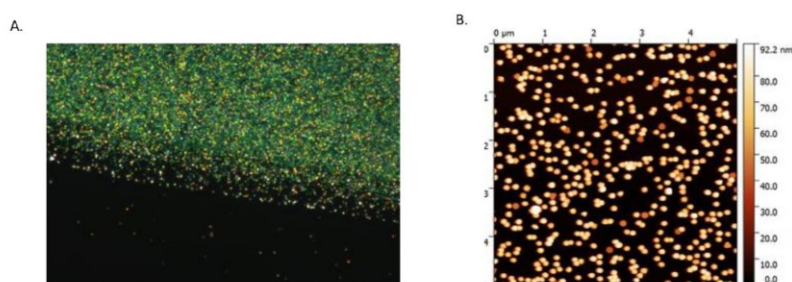
A solution of 1 % APTES in 1 mM acetic acid was prepared and let hydrolyze for 10 min. The cleaned slides were soaked with the APTES solution for 10 min. The slides were then washed in ultrapure water and gently dried with nitrogen flow.

A solution of citrate capped 80 nm gold nanoparticles (BBI Solutions, Cardiff, UK) was centrifuged 8 min at 3220 X g (Centrifuge, UniCen 15DR by Herolab GmbH, Wiesloch, Germany) and 1800 mL of supernatant discarded to get 10-fold concentrated solution of gold nanoparticles. We dropped 20  $\mu$ L of the concentrated gold nanoparticles solution in the center of the amino-functionalized glass slides and left adsorbing 60 min. The slides were then gently rinsed with ultrapure water and dried with nitrogen flow. At the end of the procedure, a red spot should be visible in the center of the glass. The so prepared chips were stored in closed petri dishes until use.

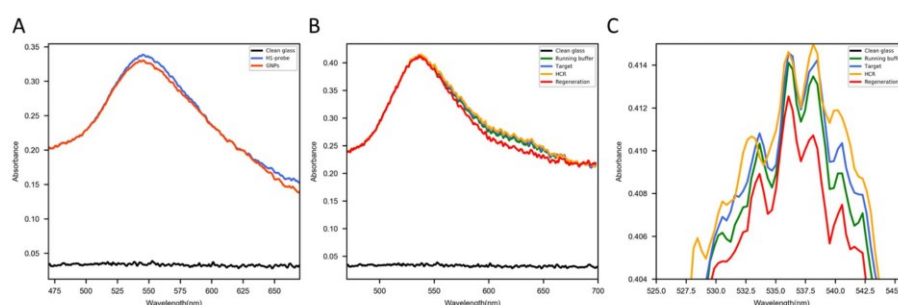
The density of adsorbed gold nanoparticles depends on the concentration of the colloidal gold and it was optimized under AFM control and checking the spectra of the immobilized gold nanoparticles. The large majority of the inter-particle distances had to be enough to get a sharp plasmon band (see spectra in Fig. 1 in the main text and in Fig. S10 below).

LSPR chips prepared as described above were rinsed with 2 mL of ultrapure water, 2 mL of EtOH and additionally 2 mL of ultrapure water. The thiolated probe was reduced using TCEP 0.5 M. We added to the probe solution in ultrapure water a volume of TCEP 0.5 M to get 20 mM in the final solution and we incubated the mixture at room temperature for at least 1 h. The probe was then diluted to 2  $\mu$ M in citrate buffer 0.5 M, pH 6.0. The immobilization was performed by layering on the chip 50  $\mu$ L of this solution and incubating for about 16 hours at room temperature in closed petri dish to avoid evaporation. After the overnight incubation, the glass slides were rinsed with 2 mL of citrate buffer, 2 mL of ultrapure water and stored in the HCR buffer.

In order to evaluate the variability in chips performances, the signal obtained injecting 1  $\mu$ M of the specific target was compared between different functionalized chips. The mean value of the signal recorded in different sensors was  $0.62 \pm 0.10$  nm, with a %CV of 0.16 %, as evaluated on 5 sensors.



**Figure S9.** A) Dark field microscopy image showing the immobilized 80 nm gold nanoparticles on the silanized glass substrate. For spherical gold nanoparticles, greenish spots are expected, due to the absorption at about 500 nm and consequently the greenish reflection. This behavior is expected for properly spaced 80 nm gold nanoparticles, while they appear reddish when locally more aggregated. B) AFM micrograph of the same chip.



**Figure S10.** Raw recorded spectra of the LSPR biosensors as prepared and at the different steps in the analytical procedure. A) spectra of an example gold nanoparticle (GNP) chip and of the pristine biosensor with the immobilized hairpin oligonucleotide probe; B) spectra of the different steps in the bioanalytical procedure; C) detail of the peak region for the spectra of panel B. Polynomial fitting was commonly used to smooth the spectra (as shown in the main text Fig. 1).

## S5.2 Measurement procedures

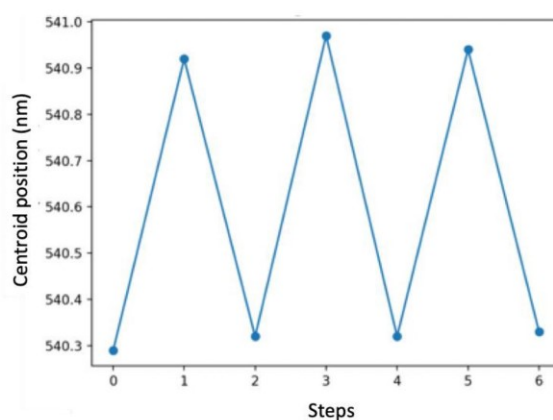
A custom-built Python program (Python 3.6) was used to perform the measurements and control the LSPR setup. The chip was inserted in the fluidic chamber in the presence of buffer, in contact with a PDMS gasket. The lamp spectrum was recorded, making sure that no over or under exposure occurred. All the measurements were done in flow conditions, a spectrum was recorded every 2 s. In order to reduce the noise affecting the position of the LSPR peak during the measurement, the centroid of the LSPR peak was calculated at each recorded point according to a previously described method (Dahlin et al. 2006). Oligonucleotides were diluted

in running buffer and heated up to 95°C for 5 min, then let cool down at room temperature before use. The measurements were performed in running buffer (see section S1). A solution of 6-mercapto-1-hexanol (MCH, by Merck KGaA, Darmstadt, Germany) 1 mM in running buffer was injected for 300 s at 20 µL/min flowrate. After MCH, the glass surface was incubated with salmon sperm DNA (Deoxyribonucleic acid sodium salt from salmon testes by Merck KGaA, Darmstadt, Germany) at a concentration of 1 mg/mL in running buffer for passivation. Target and hairpins oligonucleotides were flowed at 5 µL/min. The desired concentration of miR-17 oligo was injected for 600 s in the chamber. After the detection step, running buffer was flowed until the signal was stable. To test the hybridization chain reaction, volumes of 1 µM concentrated species of hairpins in running buffer were mixed to get 0.5 µM each and flowed in the chamber for at least 30 min at 5 µL/min. The regeneration of the sensor was obtained with 20 mM solution of HCl, injected for 600 s at 30 µL/min. The general steps and more details are summarized in Table S2.

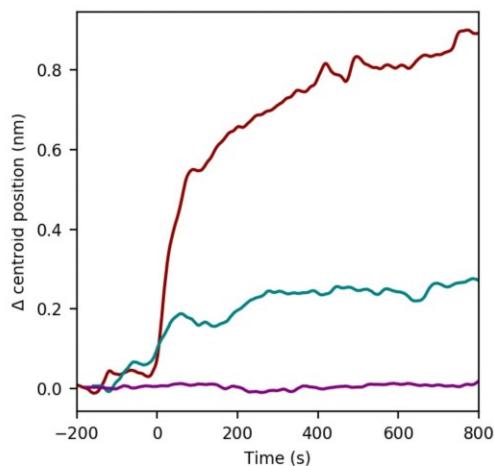


Steps	flowrate_1	flowrate_2	flowrate_3	flowrate_4	Time (s)	Step
1	20			10	300	HCR buffer
2	5			20	300	<b>MCH</b>
3	20			10	400	HCR buffer
4	5			20	300	<b>Fish</b>
5	20		10		400	HCR buffer
6	2		5		600	<b>target 1<math>\mu</math>M</b>
7	20	10			600	HCR buffer
8	2	5			1000	<b>HCR</b>
9	20			10	600	HCR buffer
10	2			30	800	<b>Regeneration</b>
11	20		10		400	HCR buffer

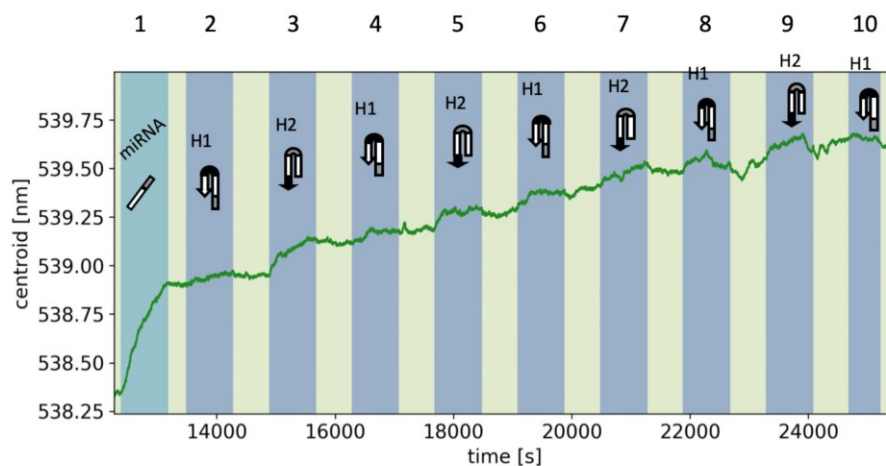
**Table S2.** Description of the protocol used during a typical experiment, with flow rate in  $\mu$ L/min for the channels available, the duration of each step in seconds and the composition of each sample flowed in the chamber in the corresponding step. A pre-flow was used to shorten the transition between the different solutions.



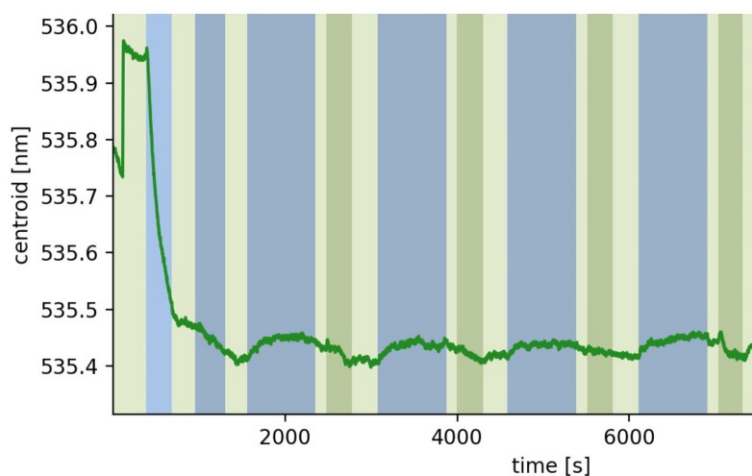
**Figure S10.** Example of testing the regeneration of the LSPR sensor with HCl 20 mM. HCl 20 mM was selected after trials with different solutions, such as NaOH 0.1 M and Urea 7 M. HCl 20 mM returned the best results in terms of signal recovery after hybridization. The spots correspond to the values of centroid position after each step. Consecutive cycles of hybridization of the target and regeneration through HCl 20 mM were performed.



**Figure S11.** Centroid position over time obtained flowing 1  $\mu$ M miR-17 sequence (red line), 1  $\mu$ M miR-106b (green line) and buffer (purple line) in the chamber. The kinetics during the measurements was very different between the two different miRNA sequences. The interaction with miR-17 is very fast and approaches the saturation of the sensor after 800 s, while miR-106b show a first steep but low interaction then the position of the centroid seems to shift much slower. Likely, after a much longer time, the shift in the centroid position would be relevant for miR-106b too, but in the timescale of the experiment the system was able to return a significantly different response thus ensuring the specificity.

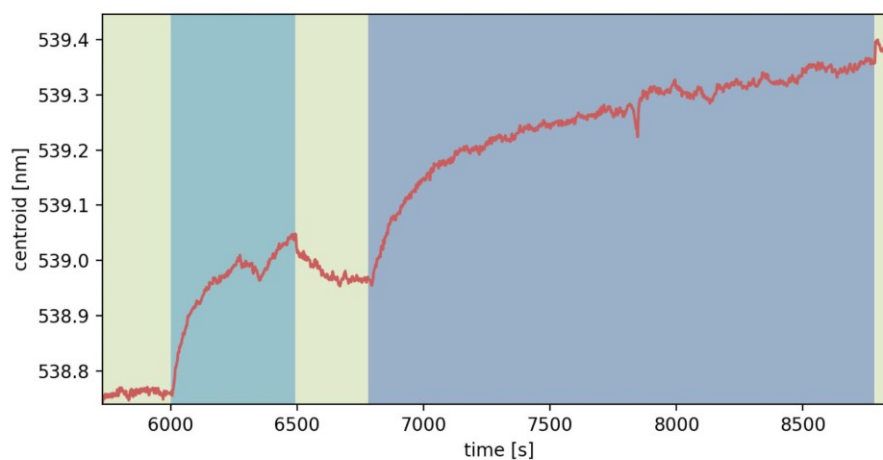


**Figure S12:** Plot of the centroid position over time with the consecutive addition of the individual hairpins one by one with steps highlighted. Aquamarine corresponds to miR-17 at 1  $\mu$ M; Blue steps correspond to individual hairpins H1 and H2. Light green is for running buffer. The first injection of hairpin H1 (step 2, at about 14000 seconds), as expected, did not lead to any change on the LSPR peak position, since H1 cannot interact with the probe, which shares the same sequence. On the other hand, H2 could interact with H1 when opened by the target, and led to a change in the peak position. In LSPR, the penetration depth is determined by the diameter of the nanoparticles in use. For spherical nanoparticles, the range is estimated to be about half of the diameter of the nanoparticle (see also in the main text). For 80 nm gold nanoparticles, the sensitivity region is expected to reach about 40 nm around the nanoparticles. In the B-DNA conformation, the HCR product would reach that length when made of 4 couples of assembled hairpins. Possible deviations from this behavior are expected depending on the packing of DNA around the nanoparticles and on the density of electrostatic charges.



**Figure S13.** Experiment performed with the aim to evaluate the non-specific absorption of the hairpins on the passivated sensor. We observed a slight shift of the LSPR peak when the mixture of hairpins was flowed (blue intervals) rapidly reaching the baseline after flowing running buffer (light green and green intervals). The chips were passivated with 1 mM MCH in running buffer. The first light blue interval corresponds to the MCH step.





**Figure S14.** Example of a measurement performed during hybridization chain reaction. The light green intervals correspond to running buffer injections, aquamarine green corresponds to miR-17 injection, while the blue interval corresponds to the injection of the mixture of hair-pins.

## S6. References

- Cai, W., Xie, S.B., Zhang, J., Tang, D.Y., Tang, Y., 2017. An electrochemical impedance biosensor for Hg<sup>2+</sup> detection based on DNA hydrogel by coupling with DNAzyme-assisted target recycling and hybridization chain reaction. *Biosensors & Bioelectronics* 98, 466-472.
- Dahlin, A.B., Tegenfeldt, J.O., Hook, F., 2006. Improving the instrumental resolution of sensors based on localized surface plasmon resonance. *Analytical Chemistry* 78(13), 4416-4423.
- Ding, L.H., Liu, H.Y., Zhang, L.N., Li, L., Yu, J.H., 2018. Label-free detection of microRNA based on the fluorescence quenching of silicon nanoparticles induced by catalyzed hairpin assembly coupled with hybridization chain reaction. *Sensors and Actuators B-Chemical* 254, 370-376.
- Guo, B., Cheng, W., Xu, Y.J., Zhou, X.Y., Li, X.M., Ding, X.J., Ding, S.J., 2017. A simple surface plasmon resonance biosensor for detection of PML/RAR alpha based on heterogeneous fusion gene-triggered nonlinear hybridization chain reaction. *Scientific Reports* 7.
- Hou, T., Li, W., Liu, X.J., Li, F., 2015. Label-Free and Enzyme-Free Homogeneous Electrochemical Biosensing Strategy Based on Hybridization Chain Reaction: A Facile, Sensitive, and Highly Specific MicroRNA Assay. *Analytical Chemistry* 87(22), 11368-11374.
- Liu, P., Yang, X.H., Sun, S., Wang, Q., Wang, K.M., Huang, J., Liu, J.B., He, L.L., 2013. Enzyme-Free Colorimetric Detection of DNA by Using Gold Nanoparticles and Hybridization Chain Reaction Amplification. *Analytical Chemistry* 85(16), 7689-7695.
- Spiga, F.M., Bonyar, A., Ring, B., Onofri, M., Vinelli, A., Santha, H., Guiducci, C., Zuccheri, G., 2014. Hybridization chain reaction performed on a metal surface as a means of signal amplification in SPR and electrochemical biosensors. *Biosensors & Bioelectronics* 54, 102-108.
- Xu, G.L., Lai, M.L., Wilson, R., Glidle, A., Reboud, J., Cooper, J.M., 2019. Branched hybridization chain reaction-using highly dimensional DNA nanostructures for label-free, reagent-less, multiplexed molecular diagnostics. *Microsystems & Nanoengineering* 5.
- Yang, C.Y., Shi, K., Dou, B.T., Xiang, Y., Chai, Y.Q., Yuan, R., 2015. In Situ DNA-Templated Synthesis of Silver Nanoclusters for Ultrasensitive and Label-Free Electrochemical Detection of MicroRNA. *Acs Applied Materials & Interfaces* 7(2), 1188-1193.
- Zhao, T., Zhang, H.S., Tang, H., Jiang, J.H., 2017. Nanopore biosensor for sensitive and label-free nucleic acid detection based on hybridization chain reaction amplification. *Talanta* 175, 121-126.

#### 4 Diskussion

Die Leistung einer Biosensor-Plattform ist von der Empfindlichkeit des Signalwandlers abhängig, welcher die biochemische Erkennung des Analyten in ein lesbares Signal übersetzt. Das Design von empfindlichen und vielseitigen Signalwandlern, die leicht in *Lab-on-a-Chip*-Geräte (LOC-Geräte) integriert werden können, ist daher eine gegenwärtige Herausforderung.

Daher wurde in 3.1.1 die Sensitivität verschiedener Nanopartikel untersucht. Die Bulksensitivität erhöht sich mit steigendem Durchmesser. Mit zunehmender Größe der Nanopartikel wird jedoch das Spektrum sehr viel breiter und damit die Messbedingungen nicht ausreichend, was die hohe Standardabweichung von  $\pm 7,4$  nm der relativen Centroidverschiebung bei Au 250 erklärt. Im Vergleich mit sphärischen Goldnanopartikeln (Au 80) besitzen Goldnanowürfel mit einer Kantenlänge von 50 nm (Au cubes) mit 126 nm/RIU ungefähr die doppelte, Goldnanosterne mit dem Außenmaß von 80 nm (Au stars) mit 189 nm/RIU die dreifache und Silbernandreiecke mit einer Kantenlänge von 50 nm (Ag triangles) die vierfache Bulksensitivität. Solche Geometrien ermöglichen höhere Amplituden der Elektronenwolkenoszillation. Dabei sind die Goldnanosterne aufgrund ihrer zahlreichen und scharfen Spitzen 50 % sensitiver als die Goldnanowürfel, welche mit acht Ecken und zwölf Kanten mehr gerade Fläche und weniger scharfe Kanten aufweisen und damit geometrisch der Kugel ähnlicher sind. Aufgrund der Steilheit der dielektrischen Funktion sind Silbernanostrukturen generell sensitiver. Weiterhin weist Silber die höchste Streueffizienz auf (Gold eine Größenordnung kleiner). Die Streueffizienz erhöht die Amplitude und induziert damit ein besseres Signal-Rausch-Verhältnis der Centroidbestimmung bei gleicher Konzentration.<sup>106–109</sup> Silber ist demnach ein hervorragendes Material für die plasmonische Detektion. Jedoch sind Silbernanostrukturen unter Umgebungsbedingungen nicht langzeitstabil.<sup>110</sup>

Neben Größe, Form und Material der Nanopartikel beeinflusst auch die Verteilung der jeweiligen Nanopartikel auf dem Glassubstrat die Sensorperformance. Das Substrat mit der höheren Belegungsdichte müsste eine 2,5-fach höhere Extinktion von 0,48 aufweisen – analog zur Belegungsdichte. Der Differenzbetrag von 0,13 entfällt auf das zweite lokale Maximum bei 810 nm – induziert durch die Plasmonenkopplung. Höhere Nanopartikeldichten erzielen ein besseres Extinktionssignal, welches wiederum das Signal-Rausch-Verhältnis erhöht. Jedoch verbreitern zu hohe Belegungsdichten den Peak, was wiederum die Bestimmung der Peak-Position erschwert. Um einen effizienten LSPR-Sensor herzustellen, muss ein ausreichender Abstand zwischen den Nanopartikeln vorhanden sein, um die Plasmonenkopplung zu begrenzen, ein scharfes Plasmonenband und hauptsächlich die Anregung des dipolaren Plasmonenmodus zu erhalten.<sup>111</sup>

Für das finale Sensordesign wurden sphärische Goldnanopartikel mit einem Durchmesser von 80 nm ausgewählt, obwohl sie nur eine Sensitivität von 67 nm/RIU aufweisen. Jedoch eignet sich ihr Spektrum aufgrund der engen Peakbreite sehr gut für die Centroidkalkulation (Genauigkeit

bei kleinen Molekülen), sie sind chemisch inert und lassen sich aufgrund ihrer Citrathülle einfach auf dem Glasträger immobilisieren. Diese Vorteile für die Biosensorik bieten die anderen Nanopartikel nicht. Speziell die formanisotropen Nanopartikel lassen sich aufgrund des jeweiligen speziellen Liganden (CTAB, CTAC) nur mithilfe aufwändiger Methoden verwenden, wodurch die Sensorproduktion komplizierter und teurer wird.

Der LSPR-basierte sequenzspezifische DNA-Nachweis in 3.1.2 basiert auf einem Protokoll, welches sowohl die Anbindung des Biorezeptors als auch die Hybridisierung und Regeneration des Targets umfasst. Neben der Thiolgruppe der *capture DNA* adsorbieren die Nukleobasen, insbesondere Adenin, zusätzlich unspezifisch an der Goldoberfläche der Nanopartikel.<sup>77,78</sup> Die unspezifisch auf der Oberfläche adsorbierten Sequenzen stehen nicht zur Hybridisierung mit dem komplementären Target zur Verfügung und daher wurde der Biosensor zur Erhöhung der Hybridisierungseffizienz mit MCH behandelt.<sup>112,113</sup> MCH verdrängt die auf der Nanopartikeloberfläche unspezifisch adsorbierten Basen und die DNA wird aufgerichtet.<sup>114</sup> Die Regeneration umfasst die Ablösung des Targets durch Deprotonierung der Basen und damit Auftrennung der Wasserstoffbrückenbindung mit NaOH. Das Signal des zweiten Hybridisierungsschrittes bleibt unter dem des ersten, da NaOH die Nanopartikel von der Sensoroberfläche sukzessive ablöst. Infolgedessen wurde auf 10 mM Salzsäure (HCl) als Regenerationschemikalie umgestellt, womit der Sensor intakt bleibt und vollständig regeneriert werden kann. Anhand eines Modellsystems wurde die Spezifität und Sensitivität des Biosensors in 3.1.3 evaluiert. Das positive Signal für das unspezifische Target weist auf unspezifische Bindung hin, vermutlich aufgrund von Sequenzhomologien und Wechselwirkung des Targets sowohl mit dem durch MCH passivierten Nanopartikel als auch der *capture DNA*. Die Negativkontrolle (Buffer) erzeugt mit  $0,06 \pm 0,03$  nm nur ein sehr geringes Signal, welches durch Rauschen, Temperaturschwankungen und minimale Unterschiede im refraktiven Index der Lösungen zustande kommt. Da das spezifische Target ein 5-fach höheres Signal induziert als das unspezifische, ist der Biosensor spezifisch für die Detektion des Targets. Des Weiteren vergrößert sich Verschiebung der Centroidposition mit zunehmender Targetkonzentration, demzufolge ist das System quantitativ und korreliert mit der Konzentration des Targets.

Typischerweise erreichen SPR-basierte Biosensoren ein Detektionslimit von 500 pM bis 10 nM Oligonukleotid,<sup>115–118</sup> während die Kombination mit neuartiger Mikrofluidik die Detektion bis in den femtomolaren Bereich ermöglicht.<sup>119</sup> Das Detektionslimit von medizinisch-relevanten DNA-Proben bewegt sich zwischen 3,5 fM und 10 nM.<sup>120</sup> Mit einer LOD von 4,1 nM liegt die Sensitivität des untersuchten LSPR-basierten Biosensors im Referenzspektrum und sechs Größenordnungen über der niedrigsten gemessenen Konzentration von 3,5 fM.

Um die hochsensitive Detektion von Biomarkern in geringen Konzentrationen zu ermöglichen, werden in 3.2 Konzepte zur Sensoroptimierung vorgestellt und untersucht.

Geordnete DNA-Origami-Arrays können den Raum in verschiedene periodische Domänen unterteilen, in die eine Vielzahl von nanoskaligen Objekten integriert und schließlich als Nanosensor für die Nanoelektronik/Nanosensorik oder die Übertragung von Strukturen in der Nanolithographie verwendet werden können.<sup>51,67–70</sup> Ionenbasierte Wechselwirkungen können hierbei genutzt werden, um ein DNA-Origami-Array zu kreieren.<sup>62,64–66</sup>

Dafür wurde zuerst die Stabilität der DNA-Origami in Lösung und auf Glimmer unter verschiedenen ionischen Bedingungen untersucht. Die Kristallstruktur von Glimmer wird typischerweise mit der chemischen Formel  $\text{KAl}_2(\text{Si}_3\text{Al})\text{O}_{10}(\text{OH})_2$  beschrieben. Glimmer besteht aus negativ geladenen Aluminiumsilikatschichten, bei denen die negative Ladung der Schichten durch die Substitution eines Viertels der  $\text{Si}^{4+}$ -Ionen durch  $\text{Al}^{3+}$ -Ionen entsteht. Diese Schichten werden durch elektrostatisch gebundene Zwischenschichtkationen – Kaliumionen ( $\text{K}^+$ ) – zusammengehalten, die die Ladung kompensieren. Die leichte Spaltung von Glimmer ist möglich durch die schwachen Bindungen zwischen den Kaliumionen und den beiden benachbarten Aluminiumsilikatschichten, und es wird angenommen, dass bei der Spaltung die atomare Struktur der Aluminiumsilikatschichten ungestört ist, während die Kaliumschicht unterbrochen wird.<sup>63,121</sup> Folglich entstehen bei der Spaltung von Glimmer durch die Ablösung der Kaliumionen negative Ladungen. Die Anbindung von ebenfalls negativ geladenen Molekülen, wie DNA, ist durch ein zweiwertiges Kation –  $\text{Mg}^{2+}$  – möglich. Liegt jedoch ein großer Überschuss an positiv geladenen Ionen vor, werden die Bindestellen blockiert und die Anbindung der DNA findet nicht mehr statt. So blockiert überschüssiges Magnesium, mehr als 10 mM, die negativen Bindestellen des Glimmers statt die Belegungsdichte zu erhöhen.

Durch die Zugabe von Natrium werden die DNA-Origami in Lösung stabilisiert. Zusätzlich sind noch Magnesiumionen aus der Synthese in der Lösung vorhanden, welche die Strukturen stabilisieren. Die Stabilität von DNA-Origami hängt zum einen entscheidend von der Verfügbarkeit von  $\text{Mg}^{2+}$ -Resten ab, die an die Phosphate im DNA-Rückgrat binden und die elektrostatische Abstoßung zwischen benachbarten Helices abschirmen. Andererseits wurde gezeigt, dass DNA-Origami in Abhängigkeit ihrer Struktur in verschiedenen Niedrig- $\text{Mg}^{2+}$ -Puffern über längere Zeiträume stabil sind.<sup>122</sup> Jedoch findet keine Immobilisierung der DNA-Origami statt, da Natrium nur ein monovalentes Kation ist und so keine zweite Bindung zum negativ geladenen Glimmer aufbauen kann. In Wasser bleiben die DNA-Origami stabil und können auch auf der Oberfläche angebunden werden, da durch die Waschschriffe nur das Magnesium aus dem Puffer und nicht das intramolekular gebundene Magnesium entfernt wird. Demzufolge stehen noch ausreichend  $\text{Mg}^{2+}$ -Reste zur Verfügung, die sowohl an das Phosphat-Rückgrat der DNA als auch an Glimmer binden.<sup>122</sup> Durch das fehlende Magnesium im Puffer kann jedoch nicht derselbe hohe Bedeckungsgrad erreicht werden wie mit Magnesium. In 1xTAE-Puffer bleiben die DNA-Origami trotz vorhandener  $\text{Mg}^{2+}$ -Reste nicht intakt. Das Vorhandensein von Ethylendiamintetraacetat (EDTA) im Puffer kann die



DNA-Origami-Denaturierung durch Chelatbildung und damit die Entfernung von  $\text{Mg}^{2+}$  aus dem Rückgrat erleichtern.<sup>122</sup> Das Resultat sind destabilisierte DNA-Origami.

Hohe  $\text{Mg}^{2+}$ -Konzentrationen sind demzufolge keineswegs eine Voraussetzung für die Aufrechterhaltung der DNA-Origami-Stabilität. Im Gegenteil, die strukturelle Integrität eines DNA-Origami kann selbst bei sehr niedrigen  $\text{Mg}^{2+}$ -Konzentrationen erhalten bleiben. Dies qualifiziert DNA-Origami für ein breites Spektrum von biophysikalischen und biomedizinischen Anwendungen, die mit hohen  $\text{Mg}^{2+}$ -Konzentrationen nicht kompatibel sind. Für die Immobilisierung der DNA-Origami auf Glimmer bleibt Magnesium jedoch essentiell und sollte die Konzentration von 10 mM nicht überschreiten.

Die intramolekulare Stabilität von DNA-Origami auf Oberflächen ist für die Integration in Netzwerke von zentralem Interesse, denn nur so kann eine nanoskalige Plattform geschaffen werden, mit deren Hilfe Nicht-DNA-Objekte, wie Nanopartikel, präzise positioniert werden können. Weiterführende Experimente zur intramolekularen Stabilität der DNA-Origami wurden mittels AFM durchgeführt. Wenn die Magnesiumkonzentration auf 1 mM gesenkt wird, brechen die DNA-Origami direkt an der Stelle der Manipulation. Die Höhe des resultierenden DNA-Materials, ist vergleichbar mit den Proben, die höhere  $\text{MgCl}_2$ -Konzentrationen enthalten, wie die hellen Areale in den AFM-Bildern zeigen. Bei einer  $\text{MgCl}_2$ -Konzentration von 1 mM scheinen jedoch benachbarte Teile des Origamis vom Substrat gelöst und gedehnt zu werden, wie auch bei Proben mit 10 mM  $\text{MgCl}_2$  beobachtet wurde. Der von der Manipulation der AFM-Spitze betroffene Teil des Origamis wird normalerweise über eine Strecke entfernt, die viel breiter ist (ca. 20 bis 40 nm) als die AFM-Spitzenbreite (weniger als 10 nm), bis zu etwa einem Drittel der Seitenlänge der Dreiecke. Dieses Verhalten ändert sich, wenn diese Experimente mit in Wasser umgepufferten DNA-Origami durchgeführt werden. Hier führt die Manipulation zu viel schärferen (schmaleren) Schnitten, die in der Regel eine viel geringere Breite aufweisen, die dem 10 nm Durchmesser der AFM-Spitze entspricht. Im Gegensatz zu magnesiumhaltigen Strukturen ist keine gedehnte DNA sichtbar. Die Variation der Ionenstärke beeinflusst sowohl die intramolekulare Stabilität des DNA-Origamis als auch die Adsorptionsstärke auf dem Substrat. Dies ist auf die zweiwertigen Ionenbrücken zwischen der negativ geladenen Glimmeroberfläche und dem Phosphatrückgrat der DNA zurückzuführen. Puffer mit niedrigerer Ionenstärke vermindern anscheinend die intramolekulare Stabilität der DNA-Origami, während die Elastizität bei höheren Ionenwerten erhöht ist. Magnesiumionen beeinflussen eindeutig die Immobilisierung und die Oberflächenanhaftung sowie die strukturelle Flexibilität von DNA-Origami auf Glimmer. Es war nicht möglich, DNA-Origami mit einer AFM-Spitze nach dem Trocknen durch Verringerung der Magnesiumionen-Konzentration zu verschieben. Dementsprechend führt die Trocknung zu einer Anhaftung und Immobilisierung, die durch die verwendete Manipulationstechnik lokal kaum überwunden werden kann. Das Umsetzen der DNA-Origami in Wasser führte nicht zur vollständigen Entfernung der Magnesiumionen,

die sich auch innerhalb der DNA-Origami-Struktur befinden, sodass eine Immobilisierung realisiert werden konnte.

Die bisher beschriebenen Experimente wurden mit einem festen Abstand der AFM-Spitzenbewegung durchgeführt. Anschließend wurde dieser Abstand variiert, um den Prozentsatz der Strukturbrüche im DNA-Origami zu untersuchen. Es wurden die gleichen nach außen gerichteten Manipulationsdistanzen angewandt, da die Ergebnisse in diesem Versuchsaufbau homogener waren. Bei einem Abstand von 44 nm bleiben fast alle wassergespülten DNA-Origami strukturell intakt. Dies ändert sich, wenn der Abstand auf 77 nm erhöht wird, wobei etwa 90 % der DNA-Origami gebrochen sind. Eine weitere signifikante Erhöhung auf 99 nm Manipulationsdistanz führt zum Aufbrechen aller Strukturen. Demnach werden Brüche des DNA-Origamis durch Erhöhen der Dehnung und der Manipulationsdistanz über einen bestimmten Schwellenwert verursacht.

Ethanol beeinflusst bekanntlich die Stabilität der DNA in Lösung. Es wird in Standardprotokollen für die Präzipitation von DNA verwendet, wobei es die elektrostatische Anziehung zwischen Natrium- und Phosphationen stört. Diese Wechselwirkungen werden in Wasser untersucht, nehmen aber zu, wenn Wasser teilweise durch Ethanol ersetzt wird. Daher wurde z.B. Propanol verwendet, um die DNA für die AFM-Bildgebung zu stabilisieren, wenn sie auf der Oberfläche immobilisiert ist.<sup>123,124</sup> Ethanol fixiert und stabilisiert DNA-Origami auf Oberflächen im Allgemeinen<sup>51,53</sup>, auf Glimmer durch Nachbehandlung<sup>125</sup> und beeinflusst die Struktur des DNA-Origami nicht<sup>126</sup>, obwohl es die Kondensation der DNA induziert<sup>127</sup>. Darüber hinaus löst Ethanol keine Salze und in diesem Fall wird erwartet, dass es die DNA durch Aufrechterhaltung der Magnesiumkonzentration und gleichzeitige Dehydrierung stabilisiert<sup>118</sup>. Auf dieser Grundlage wurden immobilisierte DNA-Origami-Strukturen mit Ethanol statt mit Wasser gespült, und auf diese Proben wurde die gleiche Reihe von Manipulationsabständen (44, 77 oder 99 nm) angewendet.

Kurze und sehr lange Manipulationsabstände von 44 bzw. 99 nm führen bei mit Wasser und Ethanol gespülten Proben zum gleichen Verhalten: Fast alle Strukturen sind nach Anwendung kurzer Manipulationsabstände noch intakt – sie weisen nur kleine Einkerbungen auf. Die Anwendung mittlerer Manipulationsabstände auf wassergespülte Proben führt jedoch zu mehr Brüchen, wobei 90 % aller manipulierten Strukturen gebrochen sind, während nur 40 % der mit Ethanol gespülten DNA-Origami gebrochenen sind. Daher scheint die Ethanol-Spülung die Stabilität und/oder Elastizität der DNA-Origamis erheblich zu erhöhen. Die höchste Stabilität zeigen DNA-Origami mit 10 mM Magnesiumchlorid und anschließender Spülung mit Ethanol. Im Gegensatz zu Wasser löst Ethanol kein Magnesium. Das ist der Grund, warum Ethanol sowohl DNA-Origami auf Glimmer als auch Magnesium in seiner inneren Struktur fixiert. Daher stabilisiert Magnesium DNA-Origami konsequent in Lösung und an der Oberfläche. Diese Ergebnisse werden durch veröffentlichte Experimente unterstützt, die bereits immobilisierte DNA-Origami von Glimmer entfernt haben.<sup>70</sup>

Die Manipulationsergebnisse in Abhängigkeit von der Magnesiumkonzentration zeigen, dass entweder die innere Stabilität von DNA-Origamis reduziert wird und/oder die Oberflächenbindung durch die Senkung der Magnesiumkonzentration geschwächt wird. Diese Annahme wird durch den zweiten Versuchssatz gestützt. So weisen DNA-Origami mit 10 mM Magnesiumchlorid und anschließender Spülung mit Ethanol die höchste intramolekulare Stabilität auf. Die Experimente erlauben jedoch keine klare Trennung zwischen den beobachteten Effekten – der Oberflächenanhaftung und der intramolekularen Stabilität.

Aufbauend auf den vorherigen Ergebnissen, wurden die DNA-Origami mithilfe von Natriumchloridzugabe remobilisiert und in einer möglichst dichten Packung auf Glimmer angeordnet, um ein geordnetes plasmonisches Array zu ermöglichen. Bei einer NaCl-Konzentration von 450 mM bildet sich eine blumenähnliche Packung ohne Fehlstellen zwischen den einzelnen DNA-Origami aus, wobei noch viel überschüssiges Material über der ersten Lage liegt. Bei der Zugabe von 600 mM NaCl überdeckt weniger überschüssiges Material die erste Lage, jedoch werden in der Detailaufnahme Fehlstellen zwischen den DNA-Origami sichtbar. Für die Anordnung von DNA-Origami werden in der Literatur verschiedene NaCl-Konzentrationen verwendet, z.B. 75 mM<sup>66</sup>, 200 mM<sup>70</sup> und 700 mM<sup>62</sup>. Ebenso variiert die DNA-Origami-Konzentration und die Inkubationszeit.<sup>62,66,70</sup> Das Zusammenspiel aller Parameter ist sehr komplex. Die Einflüsse der jeweiligen Parameter wurden untersucht und dokumentiert. So wird die Monolagenbildung bei NaCl-Konzentrationen über 150 mM verzögert.<sup>128</sup> Bei NaCl-Konzentrationen von 200 mM oder höher wird  $Mg^{2+}$  vollständig durch  $Na^+$  ersetzt, so dass der DNA-Origamimonolayer nicht gebildet wird.<sup>128</sup> Dies wird jedoch nicht durch die Experimente bestätigt, könnte jedoch eine Ursache für die Fehlstellen bei 600 mM NaCl darstellen. Ein Grund für die entstandenen Multilayer bei 450 und 600 mM ist die eventuell zu hohe DNA-Origami-Konzentration. Es wird empfohlen Konzentrationen unter 5 nM und längere Inkubationszeiten zu verwenden sowie einen wasserfesten Marker für die Immobilisierung, um einen geringen Probeneinsatz zu ermöglichen.<sup>128</sup> Das Waschen der Probe ist ein wichtiger Schritt, um überschüssige DNA und Restpuffer zu entfernen. Übermäßiges oder unzureichendes Waschen kann jedoch das DNA-Origami durch Kristallisation von Restpuffer auf der Oberfläche beim Trocknen bzw. Auswaschen von stabilisierenden  $Mg^{2+}$ -Ionen verzerren, beschädigen oder sogar desorbieren.<sup>128</sup> Durch weitere Parameteroptimierung und Ausstattung der DNA-Origami mit Molekülüberhängen für die Anbindung von Nanopartikeln können solche Monolagen die Grundlage eines plasmonischen Arrays auf Glimmer bilden. So können gezielt elektrische Felder der Nanopartikel miteinander im Mikrometermaßstab gekoppelt und so die Sensoroberfläche optimiert werden.

Noch höhere Felder können durch die Kopplung von formanisotropen Nanopartikeln erreicht werden. Hierfür wurde ein Protokoll für die Biofunktionalisierung von Goldnanowürfeln entwi-

ckelt. Bei der niedrigen Salztoleranz muss berücksichtigt werden, dass die DNA-Beladung auf ebenen Oberflächen durch elektrostatische Abstoßung und sterische Hinderung, induziert durch das negative DNA-Rückgrat und die Länge der DNA-Sequenzen, erschwert wird. Durch CTAC stabilisierte Partikel haben nur eine dünne Schutzschicht aus CTA<sup>+</sup>-Molekülen, die sie vor Veränderungen in den Medien, in denen sie suspendiert sind, abschirmen.<sup>129</sup>

Um diese funktionalisierten Goldnanowürfel präzise zu positionieren und damit eine gerichtete Kopplung für den Einzelmolekülnachweis zu erreichen, wurden die Goldnanowürfel an DNA-Origami angebunden. Üblicherweise werden Partikel in einem 10-fachen Überschuss pro Bindungsstelle zugesetzt<sup>130</sup>, um die Probe mit genügend Partikeln zu sättigen und potenziell nicht eliminierte modifizierte *staple strands* zu berücksichtigen, welche die Partikel beschichten können. Die Aggregation führte zu einem Mangel an verfügbaren Partikeln, so dass viele DNA-Origami keine Partikel aufwiesen, an die sie hybridisieren konnten. Die zuverlässige Hybridisierung eines Goldnanowürfels muss noch weiter optimiert werden, bevor der nächste Schritt, die Bildung von Goldnanowürfel-Dimerstrukturen, erfolgen kann. Um eine maximale Feldverstärkung zu erreichen, müssen die Partikel in einer bestimmten Geometrie und in einem bestimmten Abstand zueinander angeordnet werden. Die Nahfeldverstärkung nimmt im Teilchenzwischenraum um Größenordnungen zu und nimmt mit zunehmendem Teilchenabstand exponentiell ab. Simulationen von *Agrawal et al.* zeigen, dass die höchste Verstärkung bei Teilchenverhältnissen (Teilchendurchmesser/Zwischenteilchenabstand) zwischen 0,05 und 0,27 erreicht werden kann.<sup>29</sup> Folglich können die verwendeten Goldnanowürfel mit einer Größe von 49 nm mit einem Teilchenabstand von 2,5 bis 9,9 nm angeordnet werden, wobei eine Signalverstärkung erzielt wird. Daher eignet sich ein biosensorisches Detektionssystem, das auf dieser Architektur des Partikelabstands basiert, für die Detektion kleinerer Analyten, die an eine Immobilisierungsstelle im Interpartikelspalt binden können. Diese Größe wird von einer Reihe biologischer Proteine übertroffen, sodass hierfür andere Geometrien in Betracht kommen.

Eine andere Möglichkeit plasmonische Sensoren zu optimieren ist die HCR. Die HCR, als lineare Amplifikation, erweist sich auf dem Chip als sehr spezifisch und geeignet, um das Signal zu verstärken und damit geringere Target-Konzentrationen als bisher zu detektieren. Die HCR erhöht das Signal und senkt die Detektionsgrenze auf 1 pM. Damit wird das Signal um drei Größenordnungen im Vergleich zur Detektion ohne Amplifikation verstärkt. Diese LOD-Werte liegen im Bereich für die miRNA-Detektion in Körperflüssigkeiten, wobei die Konzentrationen im Bereich von femtomolaren bis nanomolaren Werten erwartet werden.<sup>131</sup> Die LOD wurde als niedrigste gemessene Zielkonzentration mit einem Signal, das höher ist als das Signal des Blindwerts, auf den Betrag der dreifachen Standardabweichung berechnet. Da das Volumen jeder Analyteninjektion 50 µL betrug, kann der LSPR-Biosensor etwa 50 Attomol miRNA detektieren. Die Fähigkeit, mit solch kleinen Volumina verdünnter miRNA-Lösung zu arbeiten, sollte die Biosensormethode mit

den verfügbaren Volumina von Patientenproben aus Flüssigbiopsien und den erforderlichen vorläufigen Probenverarbeitungsverfahren konform machen.

Andere LSPR-basierte Methoden konnten etwas niedrigere LODs als die hier berichtete erreichen, jedoch wurden wesentlich kompliziertere Anordnungen und Verfahren verwendet. *Ki et al.* berichten den Nachweis von 2,6 Attomolen in einer Probe von 200  $\mu\text{L}$  unter Verwendung komplexer nanostrukturierter LSPR-Chips in Kombination mit enzymatischer Substratfällung. Die Analysezeit der miRNA-Sensorplattform war hierbei zu lang für einen direkten Assay als *Point-of-Care*-Diagnostikinstrument in der klinischen Anwendung.<sup>132</sup>

Der vorgestellte Ansatz könnte eine ähnliche Sensitivität erreichen und weitere Verbesserungen der Testbedingungen würden diese Leistung weiter verbessern. Die von *Joshi et al.* berichtete Strategie zum miRNA-Nachweis ergab eine Nachweisgrenze von etwa 30 fM in komplexen Medien. Die vorgestellte Methode erfordert besondere Gold-Nanostrukturen und eine längere Analysezeit.<sup>133</sup> Darüber hinaus verwenden die Autoren eine lineare *capture DNA*, ohne die Unterscheidung von homologen miRNA-Sequenzen zu testen – ein kritischer Punkt bei der miRNA-Detektion. *Na et al.* stellten einen LSPR-Assay vor, bei dem HCR und DNazym-Aktivität als Doppelamplifikation verwendet wurden und der eine Nachweisgrenze von etwa 2 pM in Puffer erreicht, was nicht weit von den vorgestellten Ergebnissen entfernt ist. Ihr Gesamtprotokoll erforderte eine komplexe Manipulation, den Transfer der Proben und eine zeitaufwendige Inkubationen.<sup>134</sup> Demzufolge ist der vorgestellte Biosensor praktikabel, einfach, skalierbar, leistungsstark und für den *Point-of-Care*-Nachweis von miRNA in der Zukunft einsatzfähig.

## 5 Zusammenfassung und Ausblick

Das Ziel der vorgelegten Arbeit war die Kombination der LSPR-basierten Biosensorik mit DNA-Überstrukturen, um die typischen geringen Empfindlichkeiten dieser Sensoren zu verbessern.

Dafür wurde das Potential einer DNA-Origami-basierten Sensorplattform demonstriert. Es wurde gezeigt, dass hohe  $Mg^{2+}$ -Konzentrationen keineswegs eine Voraussetzung für die Aufrechterhaltung der DNA-Origami-Stabilität sind. Im Gegenteil, die strukturelle Integrität eines DNA-Origami kann selbst bei sehr niedrigen  $Mg^{2+}$ -Konzentrationen erhalten bleiben. Dies qualifiziert DNA-Origami für ein breites Spektrum von biophysikalischen und biomedizinischen Anwendungen, die mit hohen  $Mg^{2+}$ -Konzentrationen nicht kompatibel sind. Für die Immobilisierung der DNA-Origami auf Glimmer bleibt Magnesium jedoch essentiell und sollte die Konzentration von 10 mM nicht überschreiten. Die darauffolgenden Stabilitätsuntersuchungen auf Glimmer in Abhängigkeit von der Magnesiumkonzentration zeigten, dass entweder die innere Stabilität von DNA-Origamis reduziert wird und/oder die Oberflächenbindung durch die Senkung der Magnesiumkonzentration geschwächt wird. So weisen DNA-Origami mit 10 mM Magnesiumchlorid und anschließender Spülung mit Ethanol die höchste intramolekulare Stabilität auf. Die Experimente erlauben jedoch keine klare Trennung zwischen den beobachteten Effekten – der Oberflächenanhaftung und der intramolekularen Stabilität. Die erzielten Ergebnisse wurden genutzt, um DNA-Origami gerichtet als Array anzuordnen. Durch weitere Parameteroptimierung und Ausstattung der DNA-Origami mit Molekülüberhängen für die Anbindung von Nanopartikeln können solche Monolagen die Grundlage eines plasmonischen Arrays auf Glimmer bilden, um gezielt elektrische Felder der Nanopartikel miteinander im Mikrometermaßstab zu koppeln. Damit wäre die Anordnung der Transducer auf der Glasoberfläche nicht mehr zufällig und es könnten höhere Sensitivitäten des Systems erreicht werden.

DNA-Origami-Goldnanowürfel-Dimere als Nanosensoren stellen einen Ansatz für die hochempfindliche Einzelmoleküldetektion dar. Es wurde ein Protokoll entwickelt, welches die Biofunktionalisierung der CTAC-umhüllten Goldnanowürfel ermöglicht. Sobald die Salzstabilität der Goldnanowürfel verbessert wird und die Hybridierungseffizienzen hoch genug sind, können die DNA-Origami- und Nanopartikelstrukturen durch Agarose-Elektrophorese aufgereinigt werden. Dies würde eine Unterscheidung zwischen Strukturen mit einem DNA-Origami und solchen mit mehr als einem DNA-Origami ermöglichen. Die Strukturen können dann durch Ausschneiden der entsprechenden Bande aus dem Gel und Durchführung einer Gelelektrophorese gewonnen werden. Die gereinigten DNA-Origami-Goldnanowürfel-Hybride können dann einer weiteren Hybridisierungsreaktion unterzogen werden, um einen weiteren Goldnanowürfel an das DNA-Origami zu hybridisieren. Somit kann schließlich ein Dimer umgesetzt und auf sein Potential als Nanosensor untersucht werden.



Ein weiterer Ansatz zur Erhöhung des Sensorsignals ist eine Kombination von HCR und LSPR. Das Potential wurde anhand des Nachweises einer für asymptomatischen Lungenkrebs-spezifischen *MicroRNA* (miR-17) evaluiert. Die lineare Amplifikation wurde eingesetzt, um die geringe Sensitivität von markierungsfreien, LSPR-basierten Biosensoren zu erhöhen und sehr geringe Targetkonzentrationen spezifisch zu detektieren. Der Vorteil der vorgeschlagenen Strategie liegt in der Einfachheit der Komponenten, welche leicht herzustellen und auf der Biosensor-Plattform zu implementieren sind. Dabei wurde ein Detektionslimit von 1 pM erreicht und liegt damit im für miRNA-typischen Detektionsbereich für Körperflüssigkeiten. Da das Volumen jeder Analyteninjektion 50 µL betrug, kann der LSPR-Biosensor etwa 50 Attomol miRNA detektieren. Die Fähigkeit, mit solch kleinen Volumina verdünnter miRNA-Lösung zu arbeiten, sollte die Biosensormethode mit den verfügbaren Volumina von Patientenproben aus Flüssigbiopsien und den erforderlichen vorläufigen Probenverarbeitungsverfahren konform machen. Der vorgestellte Biosensor ist praktikabel, einfach, skalierbar, leistungsstark und für den *Point-of-Care*-Nachweis von miRNA in der Zukunft einsatzfähig.

Die vorgelegte Arbeit konnte somit das Potential der DNA-Nanotechnologie für die LSPR-basierte Biosensorik auf verschiedenen Wegen demonstrieren.

## 6 Summary and Outlook

The presented work aimed to combine LSPR-based biosensor technology with DNA superstructures to improve the typical low sensitivities of these sensors.

Therefore the potential of a DNA-origami-based sensor platform was demonstrated. It was shown that high  $Mg^{2+}$  concentrations are by no means a prerequisite for maintaining DNA-origami stability. On the contrary, the structural integrity of a DNA-origami can be maintained even at very low  $Mg^{2+}$  concentrations. This qualifies DNA-origami for a wide range of biophysical and biomedical applications that are not compatible with high  $Mg^{2+}$  concentrations. However, magnesium remains essential for the immobilization of the DNA-origami on mica and should not exceed the concentration of 10 mM. Subsequent stability studies on mica depending on the magnesium concentration showed that either the internal stability of DNA-origami is reduced and/or the surface binding is weakened by the reduction of the magnesium concentration. Thus, DNA-origami with 10 mM magnesium chloride and subsequent rinsing with ethanol show the highest intramolecular stability. However, the experiments do not allow a clear separation between the observed effects – surface adhesion and intramolecular stability. The results obtained were used to arrange DNA-origami directed as an array. By further parameter optimization and equipping DNA-origami with capture strands for the binding of nanoparticles, such monolayers can form the basis of a plasmonic array on mica to specifically couple electrical fields of the nanoparticles on micrometer scale. Thus, the arrangement of the transducers on the glass surface would no longer be random and higher sensitivities of the system can be achieved.

DNA-origami-gold-nanocube-dimers as nanosensors represent an approach for highly sensitive single-molecule detection. A protocol was developed which enabled the biofunctionalization of CTAC-capped gold nanocubes. Once the salt stability of the gold nanocubes is improved and the hybridization efficiencies are high enough, the DNA-origami-nanoparticle-structures can be purified by agarose gel electrophoresis. This would allow a distinction between structures with one DNA-origami and those with more than one DNA-origami. The structures can then be obtained by cutting out the corresponding bands from the gel and performing a gel extraction method. The purified DNA-origami-gold-nanocube-hybrids can then be subjected to a further hybridization reaction to hybridize another gold nanocube to the DNA-origami. Finally, a dimer can be realised and examined for its potential as a nanosensor.

Another approach to increase the sensor signal was the combination of HCR and LSPR. The potential was evaluated by the detection of a microRNA (miR-17) specific for asymptotic lung cancer. Linear amplification was used to increase the low sensitivity of label-free, LSPR-based biosensors and to specifically detect very low target concentrations. The strength of the proposed strategy lies in the simplicity of the components, which are easy to manufacture and implement on the

biosensor platform. A detection limit of 1 pM has been achieved, which is within the detection range for body fluids typical for miRNA. Since the volume of each analyte injection was 50  $\mu$ L, the LSPR biosensor can detect about 50 attomole miRNA. The ability to work with such small volumes of diluted miRNA solution should make the biosensor method compatible with the available volumes of patient samples from liquid biopsies and the required preliminary sample processing procedures. The biosensor presented is practical, simple, scalable, powerful, and suitable for the point-of-care detection of miRNA in the future.

The work presented was thus able to demonstrate the potential of DNA nanotechnology for LSPR-based biosensor technology in various ways.

## Literaturverzeichnis

- (1) Cammann, K. Bio-Sensors Based on Ion-Selective Electrodes. *Fresenius' Zeitschrift für Analytische Chemie* **1977**, 287 (1), 1–9.
- (2) Thevenot, D. R.; Toth, K.; Durst, R. A.; Wilson, G. S. Electrochemical Biosensors: Recommended Definitions and Classification. *Pure and applied chemistry* **1999**, 71 (12), 2333–2348.
- (3) Kim, J.; Campbell, A. S.; Ávila, B. E.-F. de; Wang, J. Wearable Biosensors for Healthcare Monitoring. *Nat Biotechnol* **2019**, 37 (4), 389–406. <https://doi.org/10.1038/s41587-019-0045-y>.
- (4) Liedberg, B.; Nylander, C.; Lunstrom, I. Surface Plasmon Resonance for Gas Detection and Biosensing. *Sensors and Actuators* **1983**, 4, 299–304.
- (5) Barber, D. J.; Freestone, I. C. An Investigation of the Origin of the Colour of the Lycurgus Cup by Analytical Transmission Electron Microscopy. *Archaeometry* **1990**, 32 (1), 33–45. <https://doi.org/10.1111/j.1475-4754.1990.tb01079.x>.
- (6) Kelly, K. L.; Coronado, E.; Zhao, L. L.; Schatz, G. C. The Optical Properties of Metal Nanoparticles: The Influence of Size, Shape, and Dielectric Environment. *J. Phys. Chem. B* **2003**, 107 (3), 668–677. <https://doi.org/10.1021/jp026731y>.
- (7) Mie, G. Beiträge Zur Optik Trüber Medien Speziell Kolloidaler Metallösungen. *Annalen der Physik* **1908**, 25, 377–445.
- (8) Faraday, M. Experimental Relations of Gold (and Other Metals) to Light. *Philos. Trans. R. Soc. London* **1857**, 147, 145–181.
- (9) Scholl, J. A.; García-Etxarri, A.; Koh, A. L.; Dionne, J. A. Observation of Quantum Tunneling between Two Plasmonic Nanoparticles. *Nano letters* **2013**, 13 (2), 564–569.
- (10) Cortie, M. B.; McDonagh, A. M. Synthesis and Optical Properties of Hybrid and Alloy Plasmonic Nanoparticles. *Chemical Reviews* **2011**, 111 (6), 3713–3735. <https://doi.org/10.1021/cr1002529>.
- (11) Khlebtsov, N. G.; Dykman, L. A. Optical Properties and Biomedical Applications of Plasmonic Nanoparticles. *Journal of Quantitative Spectroscopy and Radiative Transfer* **2010**, 111 (1), 1–35.
- (12) Olson, J.; Dominguez-Medina, S.; Hoggard, A.; Wang, L.-Y.; Chang, W.-S.; Link, S. Optical Characterization of Single Plasmonic Nanoparticles. *Chemical Society Reviews* **2015**, 44 (1), 40–57.
- (13) Saha, K.; Agasti, S. S.; Kim, C.; Li, X.; Rotello, V. M. Gold Nanoparticles in Chemical and Biological Sensing. *Chemical Reviews* **2012**, 112 (5), 2739–2779. <https://doi.org/10.1021/cr2001178>.
- (14) Sepúlveda, B.; Angelomé, P. C.; Lechuga, L. M.; Liz-Marzán, L. M. LSPR-Based Nanobiosensors. *Nano Today* **2009**, 4 (3), 244–251. <https://doi.org/10.1016/j.nantod.2009.04.001>.
- (15) Aćimović, S. S.; Ortega, M. A.; Sanz, V.; Berthelot, J.; Garcia-Cordero, J. L.; Renger, J.; Maerkl, S. J.; Kreuzer, M. P.; Quidant, R. LSPR Chip for Parallel, Rapid, and Sensitive Detection of Cancer Markers in Serum. *Nano Lett.* **2014**, 14 (5), 2636–2641. <https://doi.org/10.1021/nl500574n>.
- (16) Sanders, M.; Lin, Y.; Wei, J.; Bono, T.; Lindquist, R. G. An Enhanced LSPR Fiber-Optic Nanoprobe for Ultrasensitive Detection of Protein Biomarkers. *Biosensors and Bioelectronics* **2014**, 61, 95–101. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2014.05.009>.
- (17) Vestergaard, M.; Kerman, K.; Kim, D.-K.; Hiep, H. M.; Tamiya, E. Detection of Alzheimer's Tau Protein Using Localised Surface Plasmon Resonance-Based ImmunoChip. *Talanta* **2008**, 74 (4), 1038–1042. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2007.06.009>.
- (18) Endo, T.; Yamamura, S.; Nagatani, N.; Morita, Y.; Takamura, Y.; Tamiya, E. Localized Surface Plasmon Resonance Based Optical Biosensor Using Surface Modified Nanoparticle Layer for Label-Free Monitoring of Antigen–Antibody Reaction. *Sci. Technol. Adv. Mater.* **2005**, 6 (5), 491. <https://doi.org/10.1016/j.stam.2005.03.019>.
- (19) Endo, T.; Kerman, K.; Nagatani, N.; Takamura, Y.; Tamiya, E. Label-Free Detection of Peptide Nucleic Acid–DNA Hybridization Using Localized Surface Plasmon Resonance Based Optical Biosensor. *Anal. Chem.* **2005**, 77 (21), 6976–6984. <https://doi.org/10.1021/ac0513459>.

- (20) Schneider, T.; Jahr, N.; Jatschka, J.; Csaki, A.; Stranik, O.; Fritzsche, W. Localized Surface Plasmon Resonance (LSPR) Study of DNA Hybridization at Single Nanoparticle Transducers. *J Nanopart Res* **2013**, *15* (4), 1–10. <https://doi.org/10.1007/s11051-013-1531-7>.
- (21) Soares, L.; Csaki, A.; Jatschka, J.; Fritzsche, W.; Flores, O.; Franco, R.; Pereira, E. Localized Surface Plasmon Resonance (LSPR) Biosensing Using Gold Nanotriangles: Detection of DNA Hybridization Events at Room Temperature. *Analyst* **2014**. <https://doi.org/10.1039/c4an00810c>.
- (22) Punj, D.; Regmi, R.; Devilez, A.; Plauchu, R.; Moparthi, S. B.; Stout, B.; Bonod, N.; Rigneault, H.; Wenger, J. Self-Assembled Nanoparticle Dimer Antennas for Plasmonic-Enhanced Single-Molecule Fluorescence Detection at Micromolar Concentrations. *ACS photonics* **2015**, *2* (8), 1099–1107.
- (23) Jeong, Y.; Kook, Y.-M.; Lee, K.; Koh, W.-G. Metal Enhanced Fluorescence (MEF) for Biosensors: General Approaches and a Review of Recent Developments. *Biosensors and Bioelectronics* **2018**, *111*, 102–116. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2018.04.007>.
- (24) Tang, L.; Li, J. Plasmon-Based Colorimetric Nanosensors for Ultrasensitive Molecular Diagnostics. *ACS Sens.* **2017**, *2* (7), 857–875. <https://doi.org/10.1021/acssensors.7b00282>.
- (25) Li, M.; Cushing, S. K.; Wu, N. Plasmon-Enhanced Optical Sensors: A Review. *Analyst* **2015**, *140* (2), 386–406. <https://doi.org/10.1039/C4AN01079E>.
- (26) Kuzyk, A.; Jungmann, R.; Acuna, G. P.; Liu, N. DNA Origami Route for Nanophotonics. *ACS Photonics* **2018**, *5* (4), 1151–1163. <https://doi.org/10.1021/acsp Photonics.7b01580>.
- (27) Heck, C.; Prinz, J.; Dathe, A.; Merk, V.; Stranik, O.; Fritzsche, W.; Kneipp, J.; Bald, I. Gold Nanolenses Self-Assembled by DNA Origami. *ACS Photonics* **2017**, *4* (5), 1123–1130. <https://doi.org/10.1021/acsp Photonics.6b00946>.
- (28) Prinz, J.; Schreiber, B.; Olejko, L.; Oertel, J.; Rackwitz, J.; Keller, A.; Bald, I. DNA Origami Substrates for Highly Sensitive Surface-Enhanced Raman Scattering. *The Journal of Physical Chemistry Letters* **2013**, *4* (23), 4140–4145. <https://doi.org/10.1021/jz402076b>.
- (29) Agrawal, A.; Kriegel, I.; Milliron, D. J. Shape-Dependent Field Enhancement and Plasmon Resonance of Oxide Nanocrystals. *J. Phys. Chem. C* **2015**, *119* (11), 6227–6238. <https://doi.org/10.1021/acs.jpcc.5b01648>.
- (30) Pelton, M.; Bryant, G. W. *Introduction to Metal-Nanoparticle Plasmonics*; John Wiley & Sons, 2013.
- (31) Cheng, H.; Li, Y.; Yang, J. Effects of Shape and Size on Field Enhancement of Au Nanoparticles on SERS-Active Substrates. In *10th IEEE International Conference on Nanotechnology*; 2010; pp 732–735. <https://doi.org/10.1109/NANO.2010.5697814>.
- (32) Heuer-Jungemann, A.; Feliu, N.; Bakaimi, I.; Hamaly, M.; Alkilany, A.; Chakraborty, I.; Masood, A.; Casula, M. F.; Kostopoulou, A.; Oh, E.; Susumu, K.; Stewart, M. H.; Medintz, I. L.; Stratakis, E.; Parak, W. J.; Kanaras, A. G. The Role of Ligands in the Chemical Synthesis and Applications of Inorganic Nanoparticles. *Chem. Rev.* **2019**, *119* (8), 4819–4880. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.8b00733>.
- (33) Xia, Y. N.; Xiong, Y. J.; Lim, B.; Skrabalak, S. E. Shape-Controlled Synthesis of Metal Nanocrystals: Simple Chemistry Meets Complex Physics? *Angew Chem Int Edit* **2009**, *48* (1), 60–103. <https://doi.org/10.1002/anie.200802248>.
- (34) Love, J. C.; Estroff, L. A.; Kriebel, J. K.; Nuzzo, R. G.; Whitesides, G. M. Self-Assembled Monolayers of Thiolates on Metals as a Form of Nanotechnology. *Chemical Reviews* **2005**, *105* (4), 1103–1170.
- (35) Joshi, P. P.; Yoon, S. J.; Hardin, W. G.; Emelianov, S.; Sokolov, K. V. Conjugation of Antibodies to Gold Nanorods through Fc Portion: Synthesis and Molecular Specific Imaging. *Bioconjugate Chemistry* **2013**, *24* (6), 878–888. <https://doi.org/10.1021/bc3004815>.
- (36) Watson, J. D. ;; Crick, F. H. C. A Structure for Deoxyribose Nucleic Acid. *Nature* **1953**, *171*, 737–738.
- (37) Seeman, N. C. Nucleic Acid Junctions and Lattices. *Journal of Theoretical Biology* **1982**, *99* (2), 237–247. [https://doi.org/10.1016/0022-5193\(82\)90002-9](https://doi.org/10.1016/0022-5193(82)90002-9).
- (38) Chen, J.; Seeman, N. C. Synthesis from DNA of a Molecule with the Connectivity of a Cube. *Nature* **1991**, *350* (6319), 631–633. <https://doi.org/10.1038/350631a0>.

- (39) Rothemund, P. W. K. Folding DNA to Create Nanoscale Shapes and Patterns. *Nature* **2006**, 440 (7082), 297–302. <https://doi.org/10.1038/nature04586>.
- (40) Wang, P.; Meyer, T. A.; Pan, V.; Dutta, P. K.; Ke, Y. The Beauty and Utility of DNA Origami. *Chem* **2017**, 2 (3), 359–382.
- (41) Ke, Y.; Sharma, J.; Liu, M.; Jahn, K.; Liu, Y.; Yan, H. Scaffolded DNA Origami of a DNA Tetrahedron Molecular Container. *Nano Letters* **2009**, 9 (6), 2445–2447. <https://doi.org/10.1021/nl901165f>.
- (42) Andersen, E. S.; Dong, M.; Nielsen, M. M.; Jahn, K.; Subramani, R.; Mamdouh, W.; Golas, M. M.; Sander, B.; Stark, H.; Oliveira, C. L. P.; Pedersen, J. S.; Birkedal, V.; Besenbacher, F.; Gothelf, K. V.; Kjems, J. Self-Assembly of a Nanoscale DNA Box with a Controllable Lid. *Nature* **2009**, 459 (7243), 73–76.
- (43) Douglas, S. M.; Dietz, H.; Liedl, T.; Hogberg, B.; Graf, F.; Shih, W. M. Self-Assembly of DNA into Nanoscale Three-Dimensional Shapes. *Nature* **2009**, 459 (7245), 414–418.
- (44) Marchi, A. N.; Saaem, I.; Vogen, B. N.; Brown, S.; LaBean, T. H. Toward Larger DNA Origami. *Nano Lett.* **2014**, 14 (10), 5740–5747. <https://doi.org/10.1021/nl502626s>.
- (45) Zhang, H.; Chao, J.; Pan, D.; Liu, H.; Huang, Q.; Fan, C. Folding Super-Sized DNA Origami with Scaffold Strands from Long-Range PCR. *Chem. Commun.* **2012**, 48 (51), 6405–6407. <https://doi.org/10.1039/C2CC32204H>.
- (46) Dietz, H.; Douglas, S. M.; Shih, W. M. Folding DNA into Twisted and Curved Nanoscale Shapes. *Science* **2009**, 325 (5941), 725–730. <https://doi.org/10.1126/science.1174251>.
- (47) Iinuma, R.; Ke, Y.; Jungmann, R.; Schlichthaerle, T.; Woehrstein, J. B.; Yin, P. Polyhedra Self-Assembled from DNA Tripods and Characterized with 3D DNA-PAINT. *Science* **2014**, 344 (6179), 65–69. <https://doi.org/10.1126/science.1250944>.
- (48) Gerling, T.; Wagenbauer, K. F.; Neuner, A. M.; Dietz, H. Dynamic DNA Devices and Assemblies Formed by Shape-Complementary, Non-Base Pairing 3D Components. *Science* **2015**, 347 (6229), 1446–1452. <https://doi.org/10.1126/science.aaa5372>.
- (49) Gerdon, A. E.; Oh, S. S.; Hsieh, K.; Ke, Y.; Yan, H.; Soh, H. T. Controlled Delivery of DNA Origami on Patterned Surfaces. *Small* **2009**, 5 (17), 1942–1946. <https://doi.org/10.1002/sml.200900442>.
- (50) Kershner, R. J.; Bozano, L. D.; Micheel, C. M.; Hung, A. M.; Fornof, A. R.; Cha, J. N.; Rettner, C. T.; Bersani, M.; Frommer, J.; Rothemund, P. W. K.; Wallraff, G. M. Placement and Orientation of Individual DNA Shapes on Lithographically Patterned Surfaces. *Nature Nanotechnology* **2009**, 4 (9), 557–561. <https://doi.org/10.1038/nnano.2009.220>.
- (51) Hung, A. M.; Micheel, C. M.; Bozano, L. D.; Osterbur, L. W.; Wallraff, G. M.; Cha, J. N. Large-Area Spatially Ordered Arrays of Gold Nanoparticles Directed by Lithographically Confined DNA Origami. *Nature Nanotechnology* **2010**, 5 (2), 121–126. <https://doi.org/10.1038/nnano.2009.450>.
- (52) Yun, J. M.; Kim, K. N.; Kim, J. Y.; Shin, D. O.; Lee, W. J.; Lee, S. H.; Lieberman, M.; Kim, S. O. DNA Origami Nanopatterning on Chemically Modified Graphene. *Angewandte Chemie International Edition* **2012**, 51 (4), 912–915. <https://doi.org/10.1002/anie.201106198>.
- (53) Gopinath, A.; Rothemund, P. W. K. Optimized Assembly and Covalent Coupling of Single-Molecule DNA Origami Nanoarrays. *ACS Nano* **2014**, 8 (12), 12030–12040. <https://doi.org/10.1021/nn506014s>.
- (54) Kuzyk, A.; Yurke, B.; Toppari, J. J.; Linko, V.; Törmä, P. Dielectrophoretic Trapping of DNA Origami. *Small* **2008**, 4 (4), 447–450. <https://doi.org/10.1002/sml.200701320>.
- (55) Shen, B.; Linko, V.; Dietz, H.; Toppari, J. J. Dielectrophoretic Trapping of Multilayer DNA Origami Nanostructures and DNA Origami-Induced Local Destruction of Silicon Dioxide. *ELECTROPHORESIS* **2015**, 36 (2), 255–262. <https://doi.org/10.1002/elps.201400323>.
- (56) Bell, N. A. W.; Engst, Christian. R.; Ablay, M.; Divitini, G.; Ducati, C.; Liedl, T.; Keyser, U. F. DNA Origami Nanopores. *Nano Lett.* **2012**, 12 (1), 512–517. <https://doi.org/10.1021/nl204098n>.
- (57) Wei, R.; Martin, T. G.; Rant, U.; Dietz, H. DNA Origami Gatekeepers for Solid-State Nanopores. *Angewandte Chemie* **2012**, 124 (20), 4948–4951. <https://doi.org/10.1002/ange.201200688>.



- (58) Liu, W.; Zhong, H.; Wang, R.; Seeman, N. C. Crystalline Two-Dimensional DNA-Origami Arrays. *Angewandte Chemie International Edition* **2011**, *50* (1), 264–267. <https://doi.org/10.1002/anie.201005911>.
- (59) Sato, Y.; Endo, M.; Morita, M.; Takinoue, M.; Sugiyama, H.; Murata, S.; Nomura, S. M.; Suzuki, Y. Environment-Dependent Self-Assembly of DNA Origami Lattices on Phase-Separated Lipid Membranes. *Advanced Materials Interfaces* **2018**, *5* (14), 1800437. <https://doi.org/10.1002/admi.201800437>.
- (60) Suzuki, Y.; Endo, M.; Sugiyama, H. Lipid-Bilayer-Assisted Two-Dimensional Self-Assembly of DNA Origami Nanostructures. *Nature Communications* **2015**, *6*, 8052. <https://doi.org/10.1038/ncomms9052>.
- (61) Suzuki, Y.; Sugiyama, H.; Endo, M. Complexing DNA Origami Frameworks through Sequential Self-Assembly Based on Directed Docking. *Angewandte Chemie* **2018**, *130* (24), 7179–7183. <https://doi.org/10.1002/ange.201801983>.
- (62) Woo, S.; Rothmund, P. W. K. Self-Assembly of Two-Dimensional DNA Origami Lattices Using Cation-Controlled Surface Diffusion. *Nature Communications* **2014**, *5*, 4889. <https://doi.org/10.1038/ncomms5889>.
- (63) Ostendorf, F.; Schmitz, C.; Hirth, S.; Kühnle, A.; Kolodziej, J. J.; Reichling, M. How Flat Is an Air-Cleaved Mica Surface? *Nanotechnology* **2008**, *19* (30), 305705. <https://doi.org/10.1088/0957-4484/19/30/305705>.
- (64) Surwade, S. P.; Zhao, S.; Liu, H. Molecular Lithography through DNA-Mediated Etching and Masking of SiO<sub>2</sub>. *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133* (31), 11868–11871. <https://doi.org/10.1021/ja2038886>.
- (65) Aghebat Rafat, A.; Pirzer, T.; Scheible, M. B.; Kostina, A.; Simmel, F. C. Surface-Assisted Large-Scale Ordering of DNA Origami Tiles. *Angewandte Chemie International Edition* **2014**, *53* (29), 7665–7668. <https://doi.org/10.1002/anie.201403965>.
- (66) Kielar, C.; Ramakrishnan, S.; Fricke, S.; Grundmeier, G.; Keller, A. Dynamics of DNA Origami Lattice Formation at Solid–Liquid Interfaces. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2018**. <https://doi.org/10.1021/acsami.8b16047>.
- (67) Xiao, S.; Liu, F.; Rosen, A. E.; Hainfeld, J. F.; Seeman, N. C.; Musier-Forsyth, K.; Kliehl, R. A. Selfassembly of Metallic Nanoparticle Arrays by DNA Scaffolding. *Journal of Nanoparticle Research* **2002**, *4*, 313–317.
- (68) Sharma, J.; Chhabra, R.; Cheng, A.; Brownell, J.; Liu, Y.; Yan, H. Control of Self-Assembly of DNA Tubules Through Integration of Gold Nanoparticles. *Science* **2009**, *323* (5910), 112–116. <https://doi.org/10.1126/science.1165831>.
- (69) Pinto, Y. Y.; Le, J. D.; Seeman, N. C.; Musier-Forsyth, K.; Taton, T. A.; Kiehl, R. A. Sequence-Encoded Self-Assembly of Multiple-Nanocomponent Arrays by 2D DNA Scaffolding. *Nano Lett.* **2005**, *5* (12), 2399–2402. <https://doi.org/10.1021/nl0515495>.
- (70) Ramakrishnan, S.; Subramaniam, S.; Stewart, A. F.; Grundmeier, G.; Keller, A. Regular Nanoscale Protein Patterns via Directed Adsorption through Self-Assembled DNA Origami Masks. *ACS applied materials & interfaces* **2016**, *8* (45), 31239–31247.
- (71) Jones, M. R.; Seeman, N. C.; Mirkin, C. A. Programmable Materials and the Nature of the DNA Bond. *Science* **2015**, *347* (6224), 1260901.
- (72) Alivisatos, A. P.; Johnsson, K. P.; Peng, X.; Wilson, T. E.; Loweth, C. J.; Bruchez, M. P., Jr.; Schultz, P. G. Organization of “nanocrystal Molecules” Using DNA. *Nature* **1996**, *382* (6592), 609–611.
- (73) Mirkin, C. A.; Letsinger, R. L.; Mucic, R. C.; Storhoff, J. J. A DNA-Based Method for Rationally Assembling Nanoparticles into Macroscopic Materials. *Nature* **1996**, *382* (6592), 607–609.
- (74) Sellers, H.; Ulman, A.; Shnidman, Y.; Eilers, J. E. Structure and Binding of Alkanethiolates on Gold and Silver Surfaces: Implications for Self-Assembled Monolayers. *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115* (21), 9389–9401. <https://doi.org/10.1021/ja00074a004>.
- (75) Lee, J.-S.; Lytton-Jean, A. K. R.; Hurst, S. J.; Mirkin, C. A. Silver Nanoparticle Oligonucleotide Conjugates Based on DNA with Triple Cyclic Disulfide Moieties. *Nano Lett* **2007**, *7* (7), 2112–2115. <https://doi.org/10.1021/nl071108g>.
- (76) Steinbrück, A.; Csáki, A.; Ritter, K.; Leich, M.; Köhler, J. M.; Fritzsche, W. Gold-Silver and Silver-Silver Nanoparticle Constructs Based on DNA Hybridization of Thiol- and Amino-Functionalized Oligonucleotides. *Journal of Biophotonics* **2008**, *1* (2), 104–113.

- (77) Storhoff, J. J.; Elghanian, R.; Mirkin, C. A.; Letsinger, R. L. Sequence-Dependent Stability of DNA-Modified Gold Nanoparticles. *Langmuir : the ACS journal of surfaces and colloids* **2002**, *18* (17), 6666–6670. <https://doi.org/10.1021/la0202428>.
- (78) Kimura-Suda, H.; Petrovykh, D. Y.; Tarlov, M. J.; Whitman, L. J. Base-Dependent Competitive Adsorption of Single-Stranded DNA on Gold. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125* (30), 9014–9015. <https://doi.org/10.1021/ja035756n>.
- (79) Hurst, S. J.; Lytton-Jean, A. K. R.; Mirkin, C. A. Maximizing DNA Loading on a Range of Gold Nanoparticle Sizes. *Analytical Chemistry* **2006**, *78* (24), 8313–8318. <https://doi.org/10.1021/ac0613582>.
- (80) Li, J.; Zhu, B.; Zhu, Z.; Zhang, Y.; Yao, X.; Tu, S.; Liu, R.; Jia, S.; Yang, C. J. Simple and Rapid Functionalization of Gold Nanorods with Oligonucleotides Using an MPEG-SH/Tween 20-Assisted Approach. *Langmuir* **2015**, *31* (28), 7869–7876.
- (81) Zhang, X.; Servos, M. R.; Liu, J. Instantaneous and Quantitative Functionalization of Gold Nanoparticles with Thiolated DNA Using a PH-Assisted and Surfactant-Free Route. *Journal of the American Chemical Society* **2012**, *134* (17), 7266–7269. <https://doi.org/10.1021/ja3014055>.
- (82) Lekkerkerker, H. N. W.; Tuinier, R. Depletion Interaction. In *Colloids and the Depletion Interaction*; Lekkerkerker, H. N. W., Tuinier, R., Eds.; Lecture Notes in Physics; Springer Netherlands: Dordrecht, 2011; pp 57–108. [https://doi.org/10.1007/978-94-007-1223-2\\_2](https://doi.org/10.1007/978-94-007-1223-2_2).
- (83) Lan, X.; Lu, X.; Shen, C.; Ke, Y.; Ni, W.; Wang, Q. Au Nanorod Helical Superstructures with Designed Chirality. *J. Am. Chem. Soc.* **2015**, *137* (1), 457–462. <https://doi.org/10.1021/ja511333q>.
- (84) Zhan, P.; Wen, T.; Wang, Z.; He, Y.; Shi, J.; Wang, T.; Liu, X.; Lu, G.; Ding, B. DNA Origami Directed Assembly of Gold Bowtie Nanoantennas for Single-Molecule Surface-Enhanced Raman Scattering. *Angewandte Chemie* **2018**, *130* (11), 2896–2900. <https://doi.org/10.1002/ange.201712749>.
- (85) Tanwar, S.; Halder, K. K.; Sen, T. DNA Origami Directed Au Nanostar Dimers for Single-Molecule Surface-Enhanced Raman Scattering. *J. Am. Chem. Soc.* **2017**, *139* (48), 17639–17648. <https://doi.org/10.1021/jacs.7b10410>.
- (86) Zhang, T.; Gao, N.; Li, S.; Lang, M. J.; Xu, Q.-H. Single-Particle Spectroscopic Study on Fluorescence Enhancement by Plasmon Coupled Gold Nanorod Dimers Assembled on DNA Origami. *J. Phys. Chem. Lett.* **2015**, *6* (11), 2043–2049. <https://doi.org/10.1021/acs.jpcllett.5b00747>.
- (87) Pal, S.; Deng, Z.; Wang, H.; Zou, S.; Liu, Y.; Yan, H. DNA Directed Self-Assembly of Anisotropic Plasmonic Nanostructures. *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133* (44), 17606–17609. <https://doi.org/10.1021/ja207898r>.
- (88) Srinivas, N.; Ouldrige, T. E.; Šulc, P.; Schaeffer, J. M.; Yurke, B.; Louis, A. A.; Doye, J. P. K.; Winfree, E. On the Biophysics and Kinetics of Toehold-Mediated DNA Strand Displacement. *Nucleic Acids Research* **2013**, *41* (22), 10641–10658. <https://doi.org/10.1093/nar/gkt801>.
- (89) Yurke, B.; Turberfield, A. J.; Mills, A. P.; Simmel, F. C.; Neumann, J. L. A DNA-Fuelled Molecular Machine Made of DNA. *Nature* **2000**, *406* (6796), 605–608. <https://doi.org/10.1038/35020524>.
- (90) Zhang, D. Y.; Seelig, G. Dynamic DNA Nanotechnology Using Strand-Displacement Reactions. *Nature Chem* **2011**, *3* (2), 103–113. <https://doi.org/10.1038/nchem.957>.
- (91) Zhang, D. Y.; Winfree, E. Control of DNA Strand Displacement Kinetics Using Toehold Exchange. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131* (47), 17303–17314. <https://doi.org/10.1021/ja906987s>.
- (92) Dirks, R. M.; Pierce, N. A. Triggered Amplification by Hybridization Chain Reaction. *PNAS* **2004**, *101* (43), 15275–15278. <https://doi.org/10.1073/pnas.0407024101>.
- (93) Evanko, D. Hybridization Chain Reaction. *Nat Methods* **2004**, *1* (3), 186–186. <https://doi.org/10.1038/nmeth1204-186a>.
- (94) Spiga, F. M.; Bonyár, A.; Ring, B.; Onofri, M.; Vinelli, A.; Sántha, H.; Guiducci, C.; Zuccheri, G. Hybridization Chain Reaction Performed on a Metal Surface as a Means of Signal Amplification in SPR and Electrochemical Biosensors. *Biosensors and Bioelectronics* **2014**, *54*, 102–108. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2013.10.036>.

- (95) Li, X.; Wang, Y.; Wang, L.; Wei, Q. A Surface Plasmon Resonance Assay Coupled with a Hybridization Chain Reaction for Amplified Detection of DNA and Small Molecules. *Chem. Commun.* **2014**, 50 (39), 5049–5052. <https://doi.org/10.1039/C4CC01374C>.
- (96) Huang, J.; Wu, Y.; Chen, Y.; Zhu, Z.; Yang, X.; Yang, C. J.; Wang, K.; Tan, W. Pyrene-Excimer Probes Based on the Hybridization Chain Reaction for the Detection of Nucleic Acids in Complex Biological Fluids. *Angewandte Chemie International Edition* **2011**, 50 (2), 401–404. <https://doi.org/10.1002/anie.201005375>.
- (97) Zhang, B.; Liu, B.; Tang, D.; Niessner, R.; Chen, G.; Knopp, D. DNA-Based Hybridization Chain Reaction for Amplified Bioelectronic Signal and Ultrasensitive Detection of Proteins. *Anal. Chem.* **2012**, 84 (12), 5392–5399. <https://doi.org/10.1021/ac3009065>.
- (98) Ge, Z.; Lin, M.; Wang, P.; Pei, H.; Yan, J.; Shi, J.; Huang, Q.; He, D.; Fan, C.; Zuo, X. Hybridization Chain Reaction Amplification of MicroRNA Detection with a Tetrahedral DNA Nanostructure-Based Electrochemical Biosensor. *Anal. Chem.* **2014**, 86 (4), 2124–2130. <https://doi.org/10.1021/ac4037262>.
- (99) O'Brien, J.; Hayder, H.; Zayed, Y.; Peng, C. Overview of MicroRNA Biogenesis, Mechanisms of Actions, and Circulation. *Front. Endocrinol.* **2018**, 9. <https://doi.org/10.3389/fendo.2018.00402>.
- (100) Kilic, T.; Erdem, A.; Ozsoz, M.; Carrara, S. MicroRNA Biosensors: Opportunities and Challenges among Conventional and Commercially Available Techniques. *Biosensors and Bioelectronics* **2018**, 99, 525–546. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2017.08.007>.
- (101) Dahlin, A. B.; Tegenfeldt, J. O.; HÅKÅK, F. Improving the Instrumental Resolution of Sensors Based on Localized Surface Plasmon Resonance. *Analytical Chemistry* **2006**, 78 (13), 4416–4423. <https://doi.org/10.1021/ac0601967>.
- (102) Kvasnicka, P.; Homola, J. Optical Sensors Based on Spectroscopy of Localized Surface Plasmons on Metallic Nanoparticles: Sensitivity Considerations. *Biointerphases* **2008**, 3 (3), FD4–FD11.
- (103) Shrivastava, A.; Gupta, V. B. Methods for the Determination of Limit of Detection and Limit of Quantitation of the Analytical Methods. *Chronicles of young scientists* **2011**, 2 (1), 21.
- (104) Parsamyan, H.; Yezekyan, T.; Haroyan, H. Plasmonic Nanoparticles Arrangements for Biosensing. *Armenian Journal of Physics* **2018**, 11 (4), 241–245.
- (105) Kim, M.; Ko, S. M.; Lee, C.; Son, J.; Kim, J.; Kim, J.-M.; Nam, J.-M. Hierarchic Interfacial Nanocube Assembly for Sensitive, Selective, and Quantitative DNA Detection with Surface-Enhanced Raman Scattering. *Anal. Chem.* **2019**, 91 (16), 10467–10476. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.9b01272>.
- (106) Chumanov, G.; Sokolov, K.; Gregory, B. W.; Cotton, T. M. Colloidal Metal Films as a Substrate for Surface-Enhanced Spectroscopy. *Journal of Physical Chemistry* **1995**, 99, 9466–9471.
- (107) McFarland, A. D.; Van Duyne, R. P. Single Silver Nanoparticles as Real-Time Optical Sensors with Zeptomole Sensitivity. *Nano Letters* **2003**, 3 (8), 1057–1062.
- (108) Yguerabide, J.; Yguerabide, E. E. Resonance Light Scattering Particles as Ultrasensitive Labels for Detection of Analytes in a Wide Range of Applications. *J Cell Biochem Suppl* **2001**, Suppl 37, 71–81.
- (109) Jakab, A.; Rosman, C.; Khalavka, Y.; Becker, J.; Trügler, A.; Hohenester, U.; Sönnichsen, C. Highly Sensitive Plasmonic Silver Nanorods. *ACS Nano* **2011**, 5 (9), 6880–6885. <https://doi.org/10.1021/nn200877b>.
- (110) Sachan, R.; Ramos, V.; Malasi, A.; Yadavali, S.; Bartley, B.; Garcia, H.; Duscher, G.; Kalyanaraman, R. Oxidation-Resistant Silver Nanostructures for Ultrastable Plasmonic Applications. *Advanced Materials* **2013**, 25 (14), 2045–2050. <https://doi.org/10.1002/adma.201204920>.
- (111) Yockell-Lelièvre, H.; Lussier, F.; Masson, J.-F. Influence of the Particle Shape and Density of Self-Assembled Gold Nanoparticle Sensors on LSPR and SERS. *J. Phys. Chem. C* **2015**, 119 (51), 28577–28585. <https://doi.org/10.1021/acs.jpcc.5b09570>.
- (112) Levicky, R.; Herne, T. M.; Tarlov, M. J.; Satija, S. K. Using Self-Assembly To Control the Structure of DNA Monolayers on Gold: A Neutron Reflectivity Study. *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, 120 (38), 9787–9792. <https://doi.org/10.1021/ja981897r>.
- (113) Herne, T. M.; Tarlov, M. J. Characterisation of DNA Probes Immobilized on Gold Surfaces. *Journal of the American Chemical Society* **1997**, 119, 8916–8920.

- (114) Park, S.; Brown, K. A.; Hamad-Schifferli, K. Changes in Oligonucleotide Conformation on Nanoparticle Surfaces by Modification with Mercaptohexanol. *Nano Letters* **2004**, *4* (10), 1925–1929.
- (115) Malic, L.; Veres, T.; Tabrizian, M. Biochip Functionalization Using Electrowetting-on-Dielectric Digital Microfluidics for Surface Plasmon Resonance Imaging Detection of DNA Hybridization. *Biosensors and Bioelectronics* **2009**, *24* (7), 2218–2224.
- (116) Nelson, B. P.; Grimsrud, T. E.; Liles, M. R.; Goodman, R. M.; Corn, R. M. Surface Plasmon Resonance Imaging Measurements of DNA and RNA Hybridization Adsorption onto DNA Microarrays. *Anal Chem* **2001**, *73* (1), 1–7.
- (117) Jiang, T.; Minunni, M.; Wilson, P.; Zhang, J.; Turner, A. P.; Mascini, M. Detection of TP53 Mutation Using a Portable Surface Plasmon Resonance DNA-Based Biosensor. *Biosensors and Bioelectronics* **2005**, *20* (10), 1939–1945.
- (118) Mannelli, I.; Minunni, M.; Tombelli, S.; Wang, R.; Spiriti, M. M.; Mascini, M. Direct Immobilisation of DNA Probes for the Development of Affinity Biosensors. *Bioelectrochemistry* **2005**, *66* (1–2), 129–138.
- (119) Špringer, T.; Piliarik, M.; Homola, J. Surface Plasmon Resonance Sensor with Dispersionless Microfluidics for Direct Detection of Nucleic Acids at the Low Femtomole Level. *Sensors and Actuators B: Chemical* **2010**, *145* (1), 588–591. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2009.11.018>.
- (120) Bocková, M.; Slabý, J.; Špringer, T.; Homola, J. Advances in Surface Plasmon Resonance Imaging and Microscopy and Their Biological Applications. *Annual Review of Analytical Chemistry* **2019**, *12*, 151–176.
- (121) Müller, K.; Chang, C. C. Electric Dipoles on Clean Mica Surfaces. *Surface Science* **1969**, *14* (1), 39–51. [https://doi.org/10.1016/0039-6028\(69\)90044-2](https://doi.org/10.1016/0039-6028(69)90044-2).
- (122) Kielar, C.; Xin, Y.; Shen, B.; Kostianen, M. A.; Grundmeier, G.; Linko, V.; Keller, A. On the Stability of DNA Origami Nanostructures in Low-Magnesium Buffers. *Angewandte Chemie* **2018**, *130* (30), 9614–9618. <https://doi.org/10.1002/ange.201802890>.
- (123) Hansma, H. G.; Bezanilla, M.; Zenhausern, F.; Adrian, M.; Sinsheimer, R. L. Atomic Force Microscopy of DNA in Aqueous Solutions. *Nucleic acids research* **1993**, *21* (3), 505–512.
- (124) Hansma, H.; Vesenska, J.; Siegerist, C.; Kelderman, G.; Morrett, H.; Sinsheimer, R. L.; Elings, V.; Bustamante, C.; Hansma, P. Reproducible Imaging and Dissection of Plasmid DNA under Liquid with the Atomic Force Microscope. *Science* **1992**, *256* (5060), 1180–1184.
- (125) Nakayama, Y.; Tanaka, H.; Kawai, T. Stabilization of Deoxyribonucleic Acid Network on Mica Surface Using Post Ethanol Treatment. *Japanese Journal of Applied Physics* **2001**, *40* (8A), L824.
- (126) Kim, H.; Surwade, S. P.; Powell, A.; O'Donnell, C.; Liu, H. Stability of DNA Origami Nanostructure under Diverse Chemical Environments. *Chemistry of Materials* **2014**, *26* (18), 5265–5273.
- (127) Wang, Y.; Ran, S.; Man, B.; Yang, G. Ethanol Induces Condensation of Single DNA Molecules. *Soft Matter* **2011**, *7* (9), 4425–4434.
- (128) Ramakrishnan, S.; Grundmeier, G.; Keller, A. Directed Protein Adsorption Through DNA Origami Masks. In *DNA Nanotechnology: Methods and Protocols*; Zuccheri, G., Ed.; Methods in Molecular Biology; Springer: New York, NY, 2018; pp 253–262. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8582-1\\_17](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8582-1_17).
- (129) Meena, S. K.; Celiksoy, S.; Schäfer, P.; Henkel, A.; Sönnichsen, C.; Sulpizi, M. The Role of Halide Ions in the Anisotropic Growth of Gold Nanoparticles: A Microscopic, Atomistic Perspective. *Physical Chemistry Chemical Physics* **2016**, *18* (19), 13246–13254.
- (130) Gür, F. N.; Schwarz, F. W.; Ye, J.; Diez, S.; Schmidt, T. L. Toward Self-Assembled Plasmonic Devices: High-Yield Arrangement of Gold Nanoparticles on DNA Origami Templates. *ACS Nano* **2016**. <https://doi.org/10.1021/acsnano.6b01537>.
- (131) Zouari, M.; Campuzano, S.; Pingarrón, J. M.; Raouafi, N. Amperometric Biosensing of MiRNA-21 in Serum and Cancer Cells at Nanostructured Platforms Using Anti-DNA–RNA Hybrid Antibodies. *ACS omega* **2018**, *3* (8), 8923–8931.
- (132) Ki, J.; Lee, H. Y.; Son, H. Y.; Huh, Y.-M.; Haam, S. Sensitive Plasmonic Detection of MiR-10b in Biological Samples Using Enzyme-Assisted Target Recycling and Developed LSPR Probe. *ACS applied materials & interfaces* **2019**, *11* (21), 18923–18929.

- (133) Joshi, G. K.; Deitz-McElyea, S.; Johnson, M.; Mali, S.; Korc, M.; Sardar, R. Highly Specific Plasmonic Biosensors for Ultrasensitive MicroRNA Detection in Plasma from Pancreatic Cancer Patients. *Nano Letters* **2014**, *14* (12), 6955–6963. <https://doi.org/10.1021/nl503220s>.
- (134) Na, H.-K.; Wi, J.-S.; Son, H. Y.; Ok, J. G.; Huh, Y.-M.; Lee, T. G. Discrimination of Single Nucleotide Mismatches Using a Scalable, Flexible, and Transparent Three-Dimensional Nanostructure-Based Plasmonic MiRNA Sensor with High Sensitivity. *Biosensors and Bioelectronics* **2018**, *113*, 39–45.

### **Ehrenwörtliche Erklärung**

Hiermit erkläre ich, dass mir die geltende Promotionsordnung bekannt ist und ich die Dissertation selbst angefertigt habe, keine Textabschnitte eines Dritten oder eigener Prüfungsarbeiten ohne Kennzeichnung übernommen und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen in der Arbeit angegeben habe. Die Auswahl und Auswertung des Materials sowie die Herstellung des Manuskriptes wurde unterstützt durch die in in Übersicht zu den Manuskripten genannten Autoren. Ich habe weder die Hilfe einer kommerziellen Promotionsvermittlung in Anspruch genommen noch unmittelbar und mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen. Die vorliegende Arbeit ist noch nicht als Prüfungsarbeit oder Dissertation für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht worden.

Jena, den

Sophie Thamm

Für alle in dieser kumulativen Dissertation verwendeten Manuskripte liegen die notwendigen Genehmigungen der Verlage (*reprint permissions*) für die Zweitpublikation vor.

Jena, den

Sophie Thamm



## Danksagung

Herrn Prof. Dr. Günther Theißen danke ich für die Betreuung seitens der Friedrich-Schiller-Universität Jena und für die Hilfestellung bei der Finalisierung der Dissertation.

Besonderer Dank gilt apl. Prof. Dr. Wolfgang Fritzsche und Dr. Andrea Csáki für die Bereitstellung des Promotionsthemas und die freundliche Betreuung in der Arbeitsgruppe Nanobiophotonik am Leibniz-Institut für Photonische Technologien e.V.. Die stetige Unterstützung, unermüdliche Organisationsarbeit und Offenheit werde ich vermissen.

Desweiteren danke ich der kompletten FAG 5 für die wunderbare und einander unterstützende Zusammenarbeit. Besonders danke ich Matthias Thiele, André Dathe, David Zopf, Andreas Kleiber, Nicole Slesiona und Lisa Stolle für Diskussionen, Hilfestellungen und gemeinsame Erlebnisse. Ihr habt mich mit Kaffee versorgt, mich aufgebaut, mit mir gelacht, mit mir gezweifelt und den steinigen Weg um so vieles besser gemacht. Ein ganz besonderer Dank gilt Andrea Miti für die Einführung in ein neues Themengebiet und eine tolle, lehrreiche und lustige Zusammenarbeit während seiner Zeit in Jena. Mina Yesilyurt und Monalisa Goswami möchte ich für die gemeinsame Laborarbeit und Prof. Rainer Heintzmann für die Bereitstellung des Laseraufbaus danken. Desweiteren danke ich Prof. I-Ming Hsing und Dr. Martinus Werts für die herzliche Aufnahme in die jeweilige Gruppe und die Möglichkeit neue Erfahrungen im Labor und im jeweiligen Land machen zu können.

Matthias Urban, Robert Kretschmer, Andreas Wolff, Anett Reichert, Mark Kielpinski und Sarah Meinhardt danke ich für unsere lustigen Mittagsrunden. Besonders Sarah und Andy gilt großer Dank für die Freundschaft in sämtlichen Lebenslagen.

Ich habe in Jena für mich und Kyra ein Zuhause gefunden und dafür bin ich unglaublich dankbar. Mein tiefster Dank gilt meiner Familie – meinen Eltern, meiner Kyra, Robert und meinen engsten Freunden. Ihr hattet immerwährende Zuversicht, großes Vertrauen in mich und habt mir den Rücken gestärkt. Ohne euch und eure Unterstützung wäre es nicht möglich gewesen.